# Biochemische, kinetische und strukturelle Eigenschaften der Galaktokinase in Organen menschlicher Foeten

Eva Pouget

1979

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. von Hauner'schen Kinderspital
Direktor: Prof. Dr. K. Betke

# Biochemische, kinetische und strukturelle Eigenschaften der Galaktokinase in Organen menschlicher Foeten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians Universität zu München

vorgelegt von
Eva Pouget
aus
Pullach i. Isartal

1979

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

| | |
|---|---|
| Berichterstatter: | Priv.-Doz. Dr. J. Schaub |
| Mitberichterstatter: | Prof. Dr. K. Betke |
| Dekan: | Prof. Dr. W. Spann |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 23.10.1979 |

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

INHALT


I. EINLEITUNG . . . . . 5

II. MATERIAL . . . . . 14
1. Menschliche Gewebe . . . . . 14
2. Chemische Reagenzien . . . . . 14
3. Geräte . . . . . 14

III. METHODEN . . . . . 15
1. Gewebeaufbereitung . . . . . 15
2. Proteinbestimmung . . . . . 15
3. Vorbereitung der $^{14}$C-Galaktose . . . . . 15
4. Vorbereitung der DEAE-Cellulose . . . . . 16
5. Festlegung der Proteinkonzentration und der Inkubationszeit . . . . . 17
6. Enzymtest . . . . . 18
7. Säulenchromatographie der Reaktionsprodukte . . 20
8. Säulenchromatographie der Galaktokinase . . . . 21
9. Bestimmung der Michaelis-Konstante . . . . . 22

IV. ERGEBNISSE . . . . . 26
1. Stabilität . . . . . 26
2. Hemmung durch Chlorid-Ionen . . . . . 32
3. pH-Optimum . . . . . 34
4. Michaelis-Konstante für Galaktose . . . . . 34
5. Michaelis-Konstante für ATP . . . . . 37
6. Spezifische Aktivität . . . . . 37
7. Säulenchromatographie der Galaktokinase . . . . 41

V. DISKUSSION . . . . . 45

VI. ZUSAMMENFASSUNG . . . . . 63

VII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS . . . . . 64

VIII. LITERATURVERZEICHNIS . . . . . 65

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535722_0024

# I. EINLEITUNG

Der Galaktokinase-Mangel, eine erbliche Störung des Galaktose-Stoffwechsels, beruht auf einem angeborenen Enzymdefekt, der erst vor 14 Jahren entdeckt wurde. 1965 wies Gitzelmann (1) erstmals bei einem Patienten den Galaktokinase-Mangel nach und begründete damit ein eigenständiges Krankheitsbild.

Die Intoleranz von Galaktose, einem Bestandteil des Milchzuckers Laktose, war schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts durch von Reuß (2) beschrieben worden und wegen des vermehrten Auftretens von Galaktose im Blut als "Galaktosämie" bezeichnet worden. 1956 wiesen Kalckar et al. (3) den Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase-Mangel in den Erythrozyten eines Galaktosämie-Patienten nach. Als die Krankheit besser erforscht war, wurde offensichtlich, daß sich im Krankheitsbild der Galaktosämie zwei verschiedene Enzymdefekte mit verschiedenen klinischen Symptomen verbargen: Der Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase-Mangel und der Galaktokinase-Mangel. Das bei dieser Krankheit defekte Enzym, die Galaktokinase, ist Gegenstand der hier vorgelegten Untersuchungen.

Die Galaktokinase (EC 2.7.1.6) ist im Galaktose-Stoffwechsel das erste Enzym einer Reaktionsfolge, in der der Milchzucker-Bestandteil Galaktose in den Traubenzucker Glukose umgewandelt wird. Als Kinase hat das Enzym die Aufgabe, einen Phosphatrest des energiereichen Coenzyms ATP auf die im Blut und in den Zellen befindliche Galaktose zu übertragen. Es entsteht Galaktose-1-Phosphat, das durch zwei weitere Enzyme, die Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase (EC 2.7.7.12) und die UDP-Galaktose-4-Epimerase (EC 5.1.3.2) in phosphorylierte Glukose umgewandelt wird. Dieser Stoffwechselweg wurde 1948 von Caputto, Leloir und Trucco (4) für den Galaktose-Stoffwechsel von Hefe beschrieben (Abb.1).

Wenn beim Galaktokinase-Mangel Galaktose nicht oder nicht in ausreichendem Maße umgesetzt werden kann, steigt der Galaktose-Spiegel im Blut an. Der Körper behilft sich dann damit, daß er die überschüssige Galaktose teils im Urin ausscheidet, teils in einem alternativen Abbauweg durch eine Aldose-Reduktase in

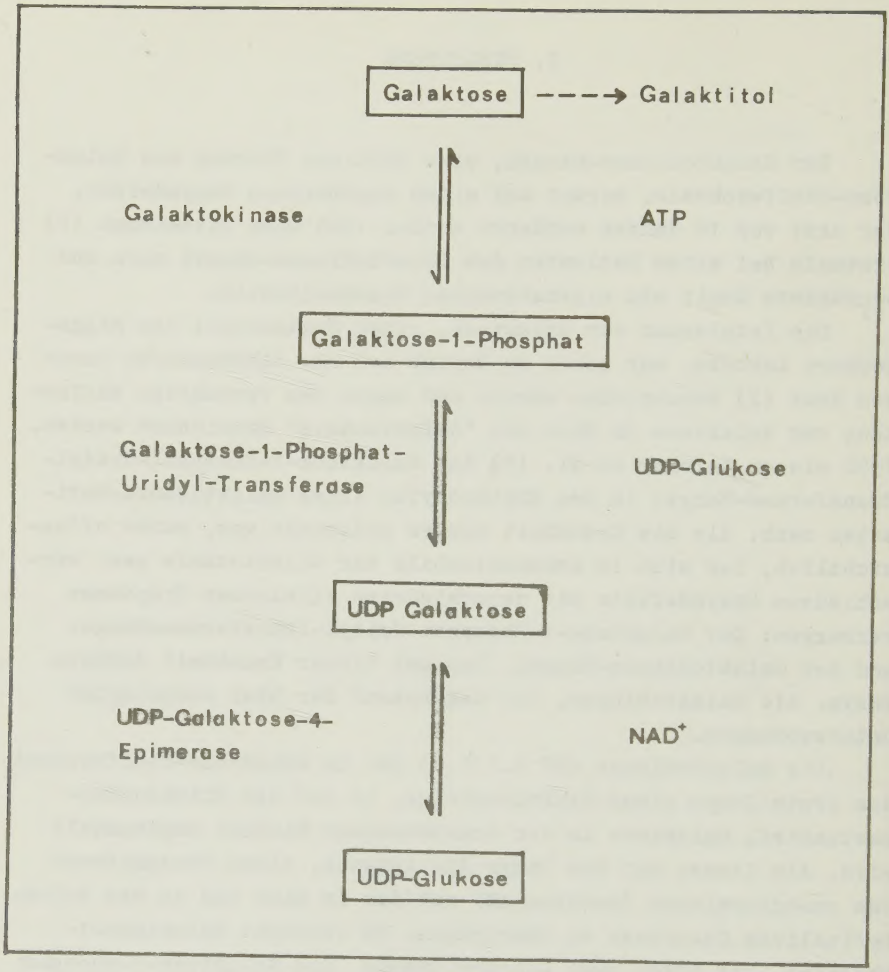



Abb.1
Galaktose-Stoffwechsel

Galaktitol umwandelt. In der Linse des Auges wird bei hoher Galaktose-Konzentration bevorzugt Galaktitol gebildet, das von Säugetieren nicht weiter abgebaut werden kann (5). Kinoshita et al. (6) zeigten 1962, daß Galaktitol-Ansammlung in der Linse mit der Bildung von Linsentrübungen, Katarakten, einhergeht.

Katarakte und Galaktose-Ausscheidung im Urin waren die einzigen klinischen Symptome der Stoffwechselstörung, die Fanconi (7) 1933 bei einem 9-jährigen Jungen mit Neurofibromatose als "Galaktose-Diabetes" bezeichnete. Als Ursache konnte Gitzelmann (1) 1965 bei dem gleichen, inzwischen 43-jährigen Patienten den Galaktokinase-Mangel nachweisen. 1966 wiesen Gitzelmann et al. (8) die Ausscheidung von Galaktitol im Urin dieses Patienten nach, der zu dieser Zeit fast erblindet war. In den Jahren 1968 bis 1974 wurden mindestens acht weitere Fälle von Galaktokinase-Mangel beschrieben, in denen Katarakte bzw. erhöhte Ausscheidung von Galaktose im Urin gefunden wurden (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16).

Die Untersuchungen an Eltern, Geschwistern und Kindern von Patienten zeigten, daß es sich um einen erblichen Enzymdefekt handelt, der höchstwahrscheinlich autosomal rezessiv vererbt wird (17). Der Galaktokinase-Mangel ist eine sehr seltene Stoffwechselstörung. Mayes und Guthrie (18) schätzten die Häufigkeit ihres Auftretens auf 1:40 000 bis 1:50 000, während Cook et al. (13) eine Häufigkeit von 1:100 000 beschrieben.

1968 beschrieben Thalhammer et al. (9) als erste die Entdeckung eines Galaktokinase-Mangels bei einem Neugeborenen durch Suchtests, sogenannte "Screening-Tests". Mit einem von Guthrie (19) entwickelten Test konnte im Blut und im Urin des bis dahin brustgestillten Neugeborenen eine Erhöhung der Galaktose-Konzentration nachgewiesen werden. Der Beweis des Enzymdefekts selbst erfolgte durch einen von Ng et al. (20) entwickelten Galaktokinase-Test, bei dem das Fehlen der Enzymaktivität in den Erythrozyten des Neugeborenen festgestellt wurde. Nach Verabreichung einer Galaktose-armen Diät sank die Galaktose-Konzentration in Blut und Urin ab und stieg bei einem Versuch mit Kuhmilch-Ernährung nach 1 Stunde wieder an. Die Bedeutung der frühen Diagnose-Stellung ist offensichtlich, da durch einen frühen Diätbeginn die schädliche Galaktose-Ansammlung in der Linse des Neugeborenen

verhindert werden kann und so die einzige, schwerwiegende Folge des Enzymdefekts ausbleibt: Die Katarakt-Bildung - und die später mögliche Erblindung.

1977 zeigten Ng et al. (21) erstmals, daß die pränatale Diagnose des Galaktokinase-Mangels in kultivierten Amnionzellen aus dem Fruchtwasser schwangerer Frauen möglich ist. Es erhebt sich die Frage, ob die Amniozentese gerechtfertigt ist, wenn - wie beim Galaktokinase-Mangel - die Krankheit mit Erfolg behandelt werden kann. Die Autoren sehen jedoch folgende Vorteile: In Familien, in denen ein Verdacht auf den Enzymdefekt vorliegt, können die Eltern durch die Diagnosestellung von Ungewißheit befreit werden; ist der Defekt bestätigt, kann die Mutter zum Schutz des Foeten eine Galaktose-arme Diät einhalten; die milchfreie Ernährung kann beim Kind unmittelbar nach der Geburt begonnen werden.

Neben den erwähnten Galaktokinase-Tests von Guthrie (19) und Ng et al. (20) wurden in den Jahren 1963 bis 1977 andere Tests beschrieben, die auf der Anwendung von radioaktiv markierter Galaktose und von Papier- bzw. Säulenchromatographie basierten (22, 23, 24, 25, 26, 27).

Diese Enzymtests dienten nicht nur zur Diagnosestellung des Galaktokinase-Mangels, sondern mehr und mehr zur Erforschung des Enzyms selbst, über dessen Eigenschaften außer der Funktion im Stoffwechsel bis 1963 nichts bekannt war. Seither wurde in zahlreichen Veröffentlichungen versucht, die Galaktokinase in verschiedenen Lebewesen darzustellen und ihre biochemischen Eigenschaften und ihre strukturelle Beschaffenheit zu beschreiben.

Ausgangsmaterial für Untersuchungen über die Galaktokinase waren unter anderem E.coli-Bakterien und Hefe, Saccharomyces cerevisiae (22, 28), Leber von Schweinen und Ratten (29, 23), menschliche Fibroblasten (18, 30, 31, 32, 33), Erythrozyten (24, 27, 34) und Leukozyten (30, 33). Galaktokinase in foetalen Zellen oder Geweben wurde bisher selten untersucht, 1965 erstmals von Cuatrecasas und Segal (23) in der Leber von Ratten-Foeten, später von Shin-Bühring et al. (27, 33, 35) in Erythrozyten, Amnionzellen und in mehreren Organen menschlicher Foeten.

Die Stabilität des Enzyms bei der Aufbewahrung und die Temperaturstabilität, die vor allem für die Versuchsdurchführung

von praktischer Bedeutung sind, wurden von einigen Autoren geprüft. Cuatrecasas und Segal (23) registrierten in Leberhomogenisaten neugeborener und erwachsener Ratten nach 24 Stunden bei 10°C 27% bzw. 62% Aktivitätsverlust. Chacko et al. (31) stellten in menschlichen Fibroblasten nach Vorinkubation über 10 Minuten bei 47°C 60% Aktivitätsverlust fest. Die Aufbewahrung von gereinigter Galaktokinase aus E.coli (22, 31) und Hefe (30) über mehrere Monate im tiefgefrorenen Zustand bei -20°C verursachte keinen oder nur einen geringen Aktivitätsverlust. Dagegen verursachte die Aufbewahrung von ungereinigter Galaktokinase aus hämolysiertem Blut bei -20°C nach der Beschreibung von Ng et al. (20) beträchtliche Aktivitätsverluste, nämlich 20% nach 1 Tag und 90% nach 6 Tagen. Bei der Aufbewahrung von Vollblut trat nach Shin-Bühring et al. (27) nach 10 Tagen bei 4°C kein Aktivitätsverlust in den Erythrozyten auf.

Zahlreicher sind die Veröffentlichungen, deren Autoren sich mit dem optimalen pH-Wert der Galaktokinase-Reaktion beschäftigten. Bis auf wenige Ausnahmen, die hier nicht berücksichtigt werden, wurden die pH-Optima mit Tris-HCl-Puffer bestimmt. Sie lagen bei Bakterien und Hefe (22, 28) zwischen pH 8.0 und pH 9.0; in den Zellen und Geweben von Säugetieren waren sie etwas niedriger. In menschlichen Fibroblasten variierten die pH-Optima stark: Hill (32) gab das Optimum bei pH 7.0 an, Tedesco und Mellmann (30) bei pH 7.5, Chacko et al. (31) bei pH 7.8, Shin-Bühring et al. (35) bei pH 7.9 und Mayes und Guthrie (18) zwischen pH 7.8 und pH 8.2. Für menschliche Leukozyten gaben Tedesco und Mellmann (30) pH 7.5 als Optimum an, während Shin-Bühring et al. (33) eine biphasische Verlaufskurve mit dem Optimum bei pH 7.4 und einem weiteren Aktivitätsgipfel bei pH 8.0 fanden. Shin-Bühring et al. (27) beschrieben für Erythrozyten von Foeten und Erwachsenen Optima bei pH 7.7 und für Erythrozyten von Neugeborenen und Kindern Optima, die zwischen pH 7.7 und pH 7.9 variierten. In anderen Arbeiten (33, 35) beschrieben sie für Amnionzellen und Leber von Foeten pH 7.9 als Optimum.

Die Hemmung der Galaktokinase-Reaktion durch verschiedene Substanzen wurde von einigen Autoren beobachtet und beschrieben. Cuatrecasas und Segal (23) fanden in Rattenleber eine Hemmung durch eine hohe Konzentration von Substrat, d.h. Galaktose, und

eine Hemmung durch das Reaktionsprodukt Galaktose-1-Phosphat, wobei auffiel, daß die Hemmung in der Leber von erwachsenen Ratten erst bei 4 bis 8 mal höheren Konzentrationen auftrat als in der Leber von foetalen Ratten. Substrathemmung durch Galaktose wurde außerdem von Ballard (29) in der Schweineleber und von Mathai und Beutler (24) in menschlichen Erythrozyten beschrieben; sie begann bei Konzentrationen, die 3 bis 10 mal bzw. 4 bis 7 mal höher waren als die jeweilige Michaelis-Konstante. Im Gegensatz zu Cuatrecasas und Segal (23) stellten Mathai und Beutler (24) keinen Unterschied in der Produkthemmung bei Erythrozyten von Foeten und Erwachsenen fest. Eine andere Überlegung dieser Autoren war, daß Hemmstoffe der Galaktokinase dazu geeignet sein könnten, die Ansammlung von Galaktose-1-Phosphat bei Galaktosämie-Patienten mit Uridyl-Transferase-Defekt zu verhindern und damit den bei diesem Defekt wahrscheinlichen gewebetoxischen Faktor auszuschalten. Die verschiedenen Galaktose-analogen Zucker, die sie testeten, wiesen jedoch keine zu diesem Zweck ausreichende Hemmkraft auf. Auch Tedesco und Mellmann (30) konnten keinen Galaktose-analogen Zucker finden, der die Galaktokinase-Reaktion ausreichend hemmte.

Die Michaelis-Konstante der Galaktokinase, die die Affinität des Enzyms zu seinen Substraten Galaktose und ATP auf charakteristische Weise kennzeichnet, wurde in den meisten Arbeiten über das Enzym bestimmt. Es waren dabei teilweise sehr unterschiedliche Versuchsbedingungen vorhanden, besonders bei den Konzentrationen von Galaktose und ATP im Inkubationsgemisch und beim pH-Wert des verwendeten Puffers.

Die Michaelis-Konstante $K_m$ der Galaktokinase für Galaktose war in E.coli und Hefe (22,28) mit 0.60 mM bis 0.70 mM Galaktose etwa 2 bis 4 mal höher als in menschlichen Zellen und Geweben. Sie erreichte in menschlichen Fibroblasten Erwachsener Werte bis zu 0.40 mM, 0.48 mM und 1.0 mM Galaktose (30, 31, 33), während sie in den Erythrozyten (26, 29, 36) bzw. Leukozyten (30) Erwachsener 0.14 mM, 0.15 mM und 0.17 mM Galaktose nicht überschritt. In der Leber von erwachsenen Ratten und Schweinen lag $K_m$ bei 0.15 mM bzw. 0.10 mM bis 0.30 mM Galaktose, war also bei diesen Säugetieren ähnlich wie beim Menschen.

Von einigen Autoren wurde die Michaelis-Konstante in der

Leber und in Zellen von menschlichen Foeten bzw. Neugeborenen untersucht. In den Erythrozyten Neugeborener fanden Mathai und Beutler (24) $K_m$ bei 0.23 mM Galaktose, Shin-Bühring et al. (27) bei 0.32 mM Galaktose. Dieselben Autoren fanden in Erythrozyten von Foeten $K_m$ bei 0.40 mM Galaktose, in Amnionzellen von Foeten bei 0.34 mM (33) und in der Leber von Foeten zwischen 0.23 mM und 0.27 mM Galaktose (35).

Cuatrecasas und Segal (23), die als erste die Ontogenese, d.h. die Entwicklung der Galaktokinase-Aktivität in der Rattenleber von der Foetalzeit bis zum Erwachsenenalter beschrieben, stellten auch erstmals Versuche über die Ontogenese der Michaelis-Konstante an. Sie stellten fest, daß $K_m$ mit steigendem Alter der Ratten absank, von 0.91 mM beim Foetus auf 0.65 mM bei der neugeborenen und 0.15 mM Galaktose bei der erwachsenen Ratte. Diese altersabhängige Abnahme der $K_m$-Werte wurde, wenn auch in weniger deutlichem Ausmaß, von Mathai und Beutler (24) und Shin-Bühring et al. (27) in menschlichen Erythrozyten bestätigt.

Die Michaelis-Konstante der Galaktokinase für ATP, die in den gleichen Zellen und Geweben wie für Galaktose bestimmt wurde, variierten unabhängig vom Ausgangsmaterial zwischen 0.10 mM und 0.52 mM ATP (22, 23, 28, 29, 30, 31, 34). Abweichend davon fanden Shin-Bühring et al. (33) in Fibroblasten von Erwachsenen $K_m$ bei 2.1 mM ATP und in Amnionzellen von Foeten bei 1.25 mM ATP.

Die Hemmung der Galaktokinase-Reaktion durch hohe Konzentrationen des Substrates Galaktose wurde von Mathai und Beutler (24) in Erythrozyten und von Ballard (29) in Schweineleber ab 1.0 mM Galaktose beschrieben. Cuatrecasas und Segal (23) beobachteten bei ihren ontogenetischen Studien in der Leber erwachsener Ratten ab 3.2 mM Galaktose Substrathemmung, in der Leber von neugeborenen Ratten ab 0.8 mM und in der Leber von Ratten-Foeten schon ab 0.4 mM Galaktose. Sie fanden auch Substrathemmung durch ATP ab 20 mM ATP in der Leber erwachsener Ratten.

Erkenntisse über die strukturelle Beschaffenheit der Galaktokinase waren das Ziel mehrerer Untersuchungen, die mit Methoden wie Chromatographie, Elektrophorese und Zentrifugieren durchgeführt wurden.

Sherman und Adler (22) fanden für die Galaktokinase in E.coli ein Molekulargewicht von 20 000; Rustum und Barnard (37)

fanden in Hefe ein Molekulargewicht von 100 000 bei einer Größe der Untereinheiten von 23 000; Blume und Beutler (34) schließlich fanden in menschlichen Erythrozyten ein Molekulargewicht von etwa 55 000 bei einer Größe der Untereinheiten von 25 000 bis 27 000. Sherman und Adler (22), Gulbinsky und Cleland (36), Blume und Beutler (34), Mathai und Beutler (24) und Vigneron (38) versuchten, in verschiedenen Organismen durch Trennung der Galaktokinase in Fraktionen bzw. Banden Aufschluß über die Zusammensetzung des Enzyms zu erhalten, was jedoch keiner der Forschergruppen möglich war.

Mathai und Beutler (24) und Vigneron (38) führten in menschlichen Erythrozyten von Neugeborenen und von Erwachsenen vergleichende Chromatographie bzw. Elektrophorese des Enzyms durch, um zu erfahren, ob z.B. eine Veränderung der spezifischen Aktivität oder der Michaelis-Konstante des Enzyms im Verlauf der Ontogenese Ausdruck für die Existenz von Isoenzymen sein könnte. Die Autoren konnten keine Isoenzyme nachweisen, jedoch entdeckte Vigneron eine höhere elektrophoretische Mobilität der Erythrozyten-Galaktokinase des Neugeborenen als bei dem Enzym des Erwachsenen.

Die Forschung über die Galaktokinase kann trotz der Vielzahl der Ergebnisse noch lange nicht als abgeschlossen betrachtet werden. Das fortdauernde Interesse an dem Enzym ist einerseits in der Aufgabe des "basic research" und andererseits im Fortschritt in der pränatalen und postnatalen Diagnostik begründet. Denn die Diagnose des Galaktokinase-Mangels beruht durch den Galaktokinase-Enzymtest auf der Kenntnis der optimalen Reaktionsbedingungen des Enzyms.

In der vorliegenden Arbeit wird über die Galaktokinase in Organen menschlicher Foeten berichtet. Solche Gewebe wurden bisher nur in einer Arbeit von Shin-Bühring et al. (35) verwendet. Als erstes werden charakteristische Eigenschaften der Galaktokinase in mehreren foetalen Organen dargestellt. Dazu wurden die Prüfung der Stabilität des Enzyms und seiner Hemmbarkeit durch Chlorid-Ionen sowie die Bestimmung des pH-Optimums ausgewählt. Es folgen Untersuchungen der Enzym-Kinetik, nämlich die Bestimmung der Michaelis-Konstante für beide Substrate. Zusätzlich

wird durch Vergleich mit den Michaelis-Konstanten in Geweben von Erwachsenen auf die Ontogenese der Michaelis-Konstante eingegangen. Zuletzt wird die Zusammensetzung der Galaktokinase in foetalen Organen untersucht, indem durch chromatographische Trennung des Enzyms in Fraktionen die Darstellung eventuell vorhandener Isoenzyme versucht wird.

## II. MATERIAL

### 1. Menschliche Gewebe

Die foetalen Gewebe stammten von gesunden Foeten und Embryos aus der II.Frauenklinik der Universität München, Lindwurmstr. Es handelte sich um legale Aborte, die bei den Müttern durch Prostaglandingabe zwischen der 7. und 28. Schwangerschaftswoche ausgelöst wurden. Das Leber- und Nierengewebe von zwei Schulkindern wurde während Operationen in unserer Klinik entnommen. Das genaue Alter der Kinder war uns nicht bekannt. Das Muskelgewebe eines Erwachsenen, das bei einer Biopsie vom Unterschenkel eines 65-jährigen Patienten entnommen wurde, stammte aus der Neurologischen Klinik der Universität München in Großhadern.

### 2. Chemische Reagenzien

$CuSO_4$ (5.5 g in 100 ml $H_2O$), Seignettesalz 1.35 g in 100 ml $H_2O$), Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz, $MgCl_2$, Tris-HCl pH 8.0, Saponin, Galaktose, NaOH, HCl und NaCl waren von Merck, Darmstadt. $Na_2CO_3$ (2% in 0.1 N NaOH) war von Fresenius, Bad Homburg. Rinderserumalbumin und ATP waren von Boehringer, Mannheim. $^{14}C$-Galaktose (10 µCi/ml in $H_2O$) war von Amersham Buchler, Braunschweig. Merkaptoäthanol war von Schuchardt, München. Servacel-DEAE-Cellulose war von Serva Feinbiochemika, Heidelberg. Szintillationsflüssigkeit (3 g 2,5-Diphenyloxazol, 0.2 g 1,4-bis-2-(5-Phenyloxazolyl), 350 g Triton X-100 und 750 ml Toluon) war von Roth, Karlsruhe und von Zinsser, Frankfurt.

### 3. Geräte

Es wurden ein Homogenisator nach Potter-Elvehjem und ein Eppendorf-Photometer mit rotempfindlichem Multiplyer, 772 nm, verwendet. Der Flüssigkeit-Szintillationszähler war von Searle, Ill., USA, die Szintillationsgefäße (20 ml) von Zinsser, Frankf.

# III. METHODEN

## 1. Gewebeaufbereitung

Die Embryos bzw. Foeten wurden unmittelbar nach dem Abgang, die Gewebe aus Operationen bzw Biopsien nach der Entnahme, in die Universitätskinderklinik gebracht und möglichst bald, unter Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4°C, verarbeitet. Bei der Organentnahme bei Embryos bzw. Foeten wurden die Gewebe nach Möglichkeit im Eisbad gehalten. Es wurden die ganze Milz, beide Nieren, Teile der Leber, der Lunge und des Großhirns, Teile des Herzmuskels im Ventrikelbereich und des Skelettmuskels im Oberschenkelbereich entnommen. Die entnommenen Gewebe wurden als Ganzes in Reagenzröhrchen bei -20°C tiefgefroren oder sofort weiterverwendet. Bis zu 3 g Gewebe wurden nach Zugabe der 4-fachen Menge von Merkaptoäthanol im Eisbad homogenisiert. Dabei wurde der Teflonkolben des Homogenisators bei 1100 Umdrehungen pro Minute 4 mal 5 Sekunden lang durch das Gewebe gedrückt. Die Homogenisate wurden anschließend mit 10 000 Umdrehungen pro Minute 30 Minuten lang bei 0°C zentrifugiert. Nach Abpipettieren der oben schwimmenden Fettschicht wurde der Überstand in Eppendorf-Gefäße gefüllt und bei -20°C tiefgefroren. Als nach Abschluß der Stabilitätsversuche feststand, daß das Einfrieren, Aufbewahren und Auftauen der Homogenisate erhebliche Aktivitätsverluste verursachte, wurde von da an nur frisch homogenisiertes Gewebe verwendet.

## 2. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der Homogenisate wurde nach der in unserem Labor modifizierten Methode von Lowry et al. (39) bestimmt.

Die Homogenisate wurden mit $H_2O$ 1:101 verdünnt und 20 µl von der Verdünnung mit 200 µl eines Kupferreagenz vermischt. Dieses Reagenz setzte sich zusammen aus 5 ml einer 2%-igen, in 0.1 N NaOH gelösten Lösung von $Na_2CO_3$ und 0.1 ml eines Gemischs;

dieses bestand aus 0.1 ml einer Lösung von 5.5 g $CuSO_4$ in 100 ml $H_2O$ und 0.01 ml einer Lösung von 1.35 g Seignettesalz in 100 ml $H_2O$. Die Homogenisatverdünnungen wurden 10 Minuten lang bei Raumtemperatur mit dem Kupferreagenz inkubiert, worauf 20 µl des Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz zugegeben wurden, das mit 2% $Na_2CO_3$ 1:1 verdünnt war. Nach einer Inkubationszeit von etwa 30 Minuten, während der die Proben bei Raumtemperatur in Dunkelheit stehen sollen, wurden 200 µl davon in die Mikroküvette des Photometers gegeben und die Extinktion bei 772 nm gemessen.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der Homogenisate aus der Extinktion unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes wurde eine Standard-Kurve angefertigt, in der die bekannten Proteinkonzentrationen einer Standard-Lösung gegen deren Extinktion aufgetragen wurden. Das als Standard-Lösung verwendete Rinderserumalbumin war auf Konzentrationen von 0.025 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml und 0.5 mg/ml verdünnt worden und wie die verdünnten Homogenisate inkubiert worden. Für den Leerwert wurde $H_2O$ in gleicher Weise inkubiert.

Die Proteinkonzentration konnte an Hand der Extinktion der einzelnen Proben aus der Standard-Kurve abgelesen werden und unter Berücksichtigung von Verdünnung und Leerwert in mg Protein pro ml Originalhomogenisat angegeben werden.

### 3. Vorbereitung der $^{14}C$-Galaktose

Die $^{14}C$-radioaktiv markierte Galaktose mußte vor der Verwendung im Galaktokinase-Test von störenden $^{14}C$-Hexoseresten, hauptsächlich Glukose, befreit werden, um bei der Zählung der $^{14}C$-Radioaktivität des Reaktionsprodukts fälschlich erhöhte Werte zu vermeiden. Diese $^{14}C$-markierten Hexosen wurden in einer Reaktion durch Hexokinase in die phosphorylierte Form übergeführt und diese mit Hilfe der Säulenchromatographie von der $^{14}C$-Galaktose getrennt.

Ein Gemisch aus 60 mCi/mMol $^{14}C$-Galaktose, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 5 mM Tris-HCl pH 8.0 und 1 bis 2 U Hexokinase wurde 60 Minuten lang bei 37°C inkubiert, 3 Minuten lang bei 95°C denaturiert und zur Chromatographie auf eine Säule gegeben, die DEAE-

Cellulose in $OH^-$-Form enthielt. Mit 5 ml $H_2O$ wurde zuerst die $^{14}C$-Galaktose eluiert, dann mit 2.5 ml 100 mM HCl die phosphorylierten $^{14}C$-Hexosen, die in der Regel 2 bis 5% der Gesamtaktivität ausmachten.

## 4. Vorbereitung der DEAE-Cellulose

Die grobkörnige Servacel-DEAE-Cellulose muß durch Waschen von Feinkornresten befreit werden, was durch Absaugen der in der Cellulose-Suspension langsamer sinkenden feinen Partikel geschieht.

10 g des DEAE-Cellulose-Pulvers wurden in 4 l $H_2O$ gelöst. Die feinen Partikel wurden durch Absaugen und Dekantieren des Überstandes entfernt. Dieser Waschvorgang wurde 2 mal wiederholt. Für die Herstellung der $OH^-$-Form der DEAE-Cellulose wurde eine im Volumen gleiche Menge 1 N NaOH zugegeben und die Lösung eine Stunde lang gerührt. Nach der Sedimentation wurde sie so lange mit $H_2O$ gewaschen, bis im Überstand mit Indikatorpapier ein neutraler pH-Wert, pH 7, gemessen wurde. Für die Herstellung der $Cl^-$-Form der DEAE-Cellulose wurde die $OH^-$-Form von 10 g DEAE-Cellulose mit 250 ml 1 N HCl vermischt, eine Stunde lang gerührt und nach der oben beschriebenen Methode so lange gewaschen, bis der pH-Wert im Überstand neutral war.

## 5. Festlegung der Proteinkonzentration und der Inkubationszeit

Als Voraussetzung für die Gültigkeit von Enzymtests sind eine geeignete Proteinkonzentration und eine geeignete Inkubationszeit anzusehen.

Bei der Galaktokinase-Reaktion spielen neben der Substratkonzentration die Enzymaktivität und die Enzymkonzentration, die der Proteinkonzentration entspricht, eine wichtige Rolle. Bei einer gegebenen Substratkonzentration soll zwischen Proteinkonzentration und Enzymaktivität eine lineare Beziehung bestehen. Dies ist so lange der Fall, wie genügend Substrat vorhanden ist.

Die Inkubationszeit soll lang genug gewählt werden, um

einen ausreichenden Umsatz des Enzyms zu ermöglichen, ohne daß jedoch das Substrat vor Ende der Inkubation verbraucht ist. Auch die Beziehung zwischen der Inkubationszeit und der Enzymaktivität soll also linear sein. Bei Organen mit hoher Enzymaktivität und Proteinkonzentration, wie z.B. bei der Leber, darf die Proteinkonzentration im Inkubationsgemisch nicht zu hoch sein und die Inkubationszeit nicht zu lang, damit während der ganzen Reaktion eine ausreichende Sättigung mit Substrat gegeben ist.

Die Galaktokinase-Aktivität in den Homogenisaten foetaler Organe wurde bei konstanter Galaktose-Konzentration in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration ermittelt. Es wurden folgende Proteinverdünnungen verwendet: 0.11 mg/ml, 0.23 mg/ml, 0.47 mg/ml, 1.08 mg/ml, 2.07 mg/ml und 4.55 mg/ml. In der Leberprobe eines Foeten stieg die Galaktokinase-Aktivität bis etwa 0.5 mg/ml Protein linear an (Abb.2). In anderen foetalen Organen stieg sie bis etwa 1.0 mg/ml Protein linear an. Für den Enzymtest wurden die Homogenisate so verdünnt, daß in 50 µl der Verdünnung des Leberhomogenisats 10-25 µg Protein, einer Konzentration von 0.2-0.5 mg/ml entsprechend, enthalten war und in den Homogenisat-Verdünnungen der anderen Organe 25-50 µg Protein, einer Konzentration von 0.5-1.0 mg/ml entsprechend. Die höhere Proteinkonzentration in diesen Proben ist wegen der im Vergleich zur Leber relativ niedrigen spezifischen Aktivität der Galaktokinase in diesen Organen nötig.

Die Abhängigkeit der Galaktokinase-Aktivität von der Inkubationszeit wurde bei Inkubationszeiten von 1, 2, 3, 5, 10, 15, 30, 60 und 90 Minuten bestimmt. Die Aktivität stieg in der Leberprobe eines Foeten (Abb.3) und in den Proben der anderen Organe bis 90 Minuten Inkubationszeit linear an. Die Inkubationszeit für alle Enzymtests wurde auf 60 Minuten festgelegt.

## 6. Enzymtest

Die Bestimmung der Galaktokinase-Aktivität wurde nach einer Methode durchgeführt, die 1965 von Cuatrecasas und Segal (23) beschrieben worden war und in unserem Labor modifiziert wurde (27, 35). Sie basiert auf der Umwandlung von $^{14}$C-radioaktiv

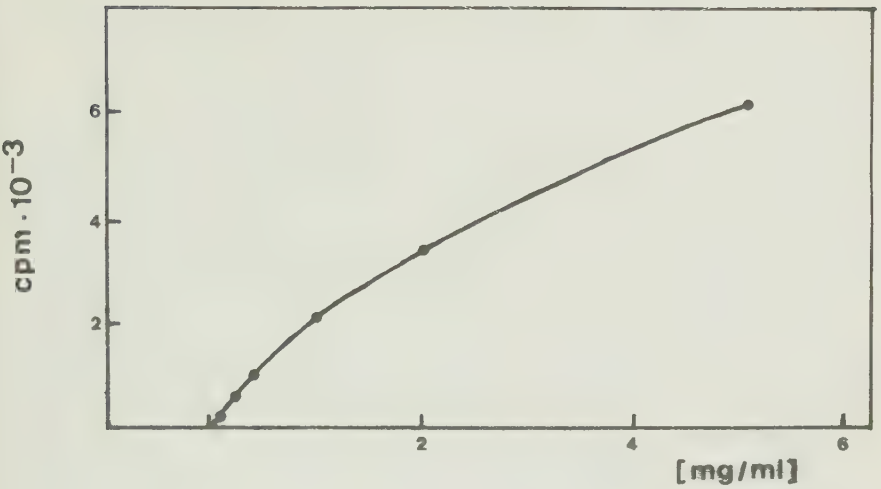



Abb.2

Abhängigkeit der Galaktokinase-Aktivität von der Proteinkonzentration im Inkubationsgemisch

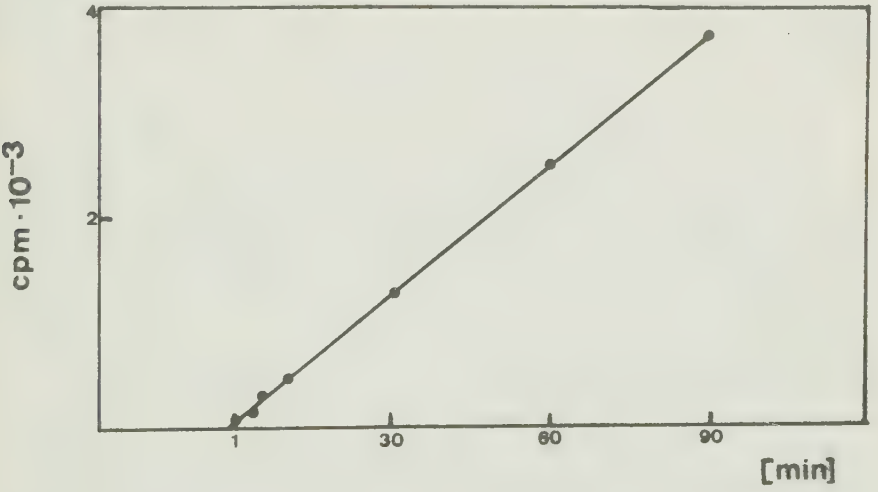



Abb.3

Abhängigkeit der Galaktokinaseaktivität von der Inkubationszeit bei 37°C

markierter Galaktose in $^{14}$C-Galaktose-1-Phosphat, das durch Säulenchromatographie isoliert und mit Hilfe eines Flüssigkeit-Szintillationszählers quantitativ bestimmt werden kann.

Die Homogenisate wurden je nach Proteingehalt 1:5, 1:11 oder 1:41 mit $H_2O$ verdünnt und 50 µl der Verdünnung mit 100 µl eines Galaktokinase-Reaktionsgemischs 60 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 3 Minuten lang bei 95° C denaturiert, im Eisbad abgekühlt und zentrifugiert. Für den Leerwert wurden 50 µl $H_2O$ mit 100 µl des Reaktionsgemischs inkubiert.

Das Galaktokinase-Reaktionsgemisch enthielt, in Endkonzentrationen, 0.2% Saponin, 8 mM NaF, 8 mM $MgCl_2$, 200 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM Galaktose, 0.6 mM $^{14}$C-Galaktose (10 µCi/ml), 4 mM Merkaptoäthanol und 2 mM ATP.

Bei der Bestimmung der Michaelis-Konstanten für Galaktose wurden folgende Galaktose-Konzentrationen im sonst gleichen Reaktionsgemisch verwendet: 0.04 mM. 0.08 mM, 0.17 mM, 0.33 mM, 0.67 mM 1.33 mM, 2.68 mM und 5.35 mM Galaktose.

Bei der Bestimmung der Michaelis-Konstanten für ATP wurden folgende ATP-Konzentrationen im sonst gleichen Reaktionsgemisch verwendet: 0.16 mM, 0.33 mM, 0.66 mM, 1.33 mM, 5.33 mM und 8 mM ATP.

## 7. Säulenchromatographie der Reaktionsprodukte

Die Trennung der Reaktionsprodukte von nicht umgesetzten Substratresten wurde nach einer säulenchromatographischen Methode mit DEAE-Cellulose durchgeführt. Diese Methode, die in unserem Labor entwickelt worden war (27), basiert auf den unterschiedlichen Dissoziationskonstanten der nicht phosphorylierten und der phosphorylierten Galaktose, da nur diese mit der Phosphatgruppe in der als Ionenaustauscher fungierenden Cellulose gebunden wird. Die Methode erlaubt bei niedrigen Leerwerten und guten Doppelwerten die gleichzeitige Chromatographie von 30 Proben in ein bis zwei Stunden und wurde deshalb der von vielen Autoren verwendeten Papierchromatographie vorgezogen.

Zur Säulenchromatographie wurden 2-ml-Einmalspritzen aus

Plastik verwendet, aus denen der Kolben entfernt und die untere Öffnung mit Glaswolle abgedeckt wurde. 2 ml der auf Raumtemperatur erwärmten DEAE-Cellulose in $OH^-$-Form wurden mit einer Pasteurpipette in die Spritze gefüllt, wobei nach Abtropfen des Wassers 0.8 ml Cellulose-Festsubstanz zurückblieb. Darauf wurden 100 µl des zentrifugierten Probenüberstandes gegeben und einziehen gelassen.

Durch zweimalige Zugabe von je 2 ml $H_2O$ wurden die nicht umgesetzten Galaktose-Reste in 2 Fraktionen ausgewaschen, die aufgefangen und verworfen wurden. Durch zweimalige Zugabe von je 1.5 ml 100 mM HCl wurde dann das Reaktionsprodukt Galaktose-1-Phosphat in 2 Fraktionen ausgewaschen, die direkt in Szintillationsgefäßen aufgefangen und mit je 12.5 ml Szintillationsflüssigkeit vermischt wurden. Die Radioaktivität dieser zuletzt eluierten Fraktionen wurde in einem Flüssigkeit-Szintillationszähler in "counts per minute" (cpm) gezählt. Für die Bestimmung der Gesamtradioaktivität wurden 100 µl des zentrifugierten Probenüberstandes nicht chromatographiert, sondern mit 1.4 ml 100 mM HCl und 12.5 ml Szintillationsflüssigkeit vermischt und die darin enthaltene Radioaktivität wir bei den anderen Proben gezählt.

Aus dem Verhältnis der Radioaktivität des Reaktionsprodukts zur Gesamtradioaktivität wurde unter Berücksichtigung des Leerwerts, der Proteinkonzentration, der Verdünnung und der Inkubationszeit die spezifische Aktivität der Galaktokinase errechnet und in "Units" (U) angegeben. 1 U entspricht derjenigen Galaktokinase-Aktivität, welche die Umwandlung von 1 nMol Galaktose in Galaktose-1-Phosphat pro mg Protein pro Minute bei 37°C katalysiert.

## 8. Säulenchromatographie der Galaktokinase

Die Säulenchromatographie des Enzyms erfolgte nach der folgenden, in unserem Labor entwickelten Methode. Durch die Zugabe eines Puffers, dessen Konzentration exponentiell ansteigt, können Enzymbestandteile mit unterschiedlichen Dissoziations-

konstanten nacheinander eluiert und in den einzelnen Fraktionen durch den Galaktokinase-Test nachgewiesen werden.

Die oben beschriebene Plastikspritze wurde mit so viel DEAE-Cellulose in $Cl^-$-Form gefüllt, daß nach dem Abtropfen des Wassers 2 ml Cellulose-Festsubstanz darin enthalten war; diese wurde mit 5 ml 0.01 M NaCl ins Gleichgewichts gebracht. 0.5 bis 0.8 ml des unverdünnten Homogenisats, entsprechend einer Proteinmenge von 10-30 mg, wurde auf die Säule gegeben und einziehen gelassen. Anschlie end wurde die Cellulose-Säule mit einem exponentiellen Gradienten von 10 ml 0.01 M bis 0.3 M NaCl chromatographiert und mit 1 ml 0.6 M NaCl die Restaktivität entfernt. Die kontinuierliche Zufuhr des Puffers erfolgte durch eine peristaltische Pumpe mit einer Fließgeschwindigkeit von etwa 0.08 ml pro Minute. In einem automatischen Fraktionensammler wurden 22 Fraktionen des Eluats zu je 0.5 ml aufgefangen und mit je 50 µl davon nach der oben beschriebenen Methode die Enzymaktivität bestimmt. Das eluierte Protein wurde mit 50 µl $H_2O$ verdünnt, um die Konzentration von NaCl zu verringern, das nach den vorliegenden Ergebnissen eine Hemmung der Galaktokinase-Reaktion bewirkt.

## 9. Bestimmung der Michaelis-Konstante

Michaelis und Menten beschrieben 1913 erstmals die Beziehung zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms und der Konzentration seines Substrats (42). Nach ihrer Theorie bildet das Enzym (E) mit seinem Substrat (S) vorübergehend einen Enzym-Substrat-Komplex (ES). In diesem wird das Substrat umgesetzt und als Produkt (P) aus dem Komplex entlassen. Die Reaktion lautet als Gleichung:

(1) $$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$$

Unter der Anwendung des Massenwirkungsgesetzes entsteht die Beziehung

(2) $$\frac{(E) \cdot (S)}{(ES)} = K,$$

wobei K die Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes darstellt. Bei gleichbleibender Konzentration von E ist die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion proportional der Konzentration von S. Wird diese nach und nach erhöht, so wird immer mehr Enzym in den Enzym-Substrat-Komplex übergeführt: Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt an, bis alles Enzym als Komplex vorliegt. Es ist dann mit Substrat gesättigt und die Reaktionsgeschwindigkeit hat ihre maximale Größe, $v_{max}$, erreicht (Abb.4).

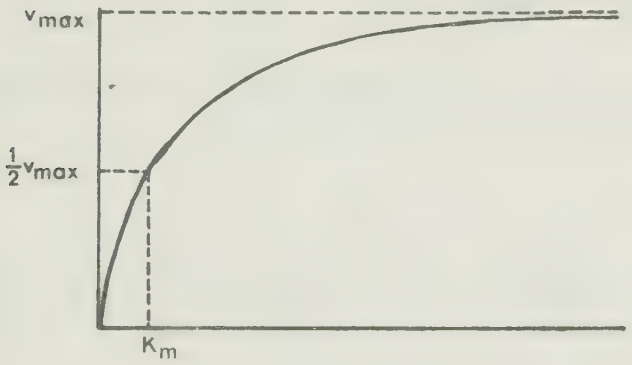



Abb.4
Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration bei konstanter Enzymkonzentration

Aus der Kurve läßt sich die Sättigungskonzentration schlecht ablesen. Ein guter Bezugspunkt ist dagegen die halbmaximale Geschwindigkeit. Hier liegt die eine Hälfte des vorhandenen Enzyms als ES, die andere Hälfte als E vor. Da also ES gleich E ist, hängt die Reaktionsgeschwindigkeit nach Gleichung (2) nur noch von der Substratkonzentration ab.

$$(S)_{\text{halbmaximale Geschwindigkeit}} = K_m$$

Die Dissoziationskonstante K entspricht also der Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit und heißt nach dem Begründer der Theorie "Michaelis-Konstante". Sie wird in Mol/l bzw. in mMol/l angegeben.

Eine exakte mathematische Methode zur Bestimmung der Michaelis-Konstante lieferten Lineweaver und Burk (41) im Jahr 1934. Sie wandelten die Kurve, die sie aus der Reaktionsgeschwindigkeit erhielten, durch doppelt reziproke Auftragung in eine Gerade um. In der Geradengleichung $y = ax + b$ entspricht

$$y = \frac{1}{v}, \quad a = \frac{K_m}{v_{max}}, \quad x = \frac{1}{(S)} \quad \text{und} \quad b = \frac{1}{v_{max}}.$$

$K_m$ läßt sich aus dem reziproken Wert des Schnittpunkts der Geraden mit der x-Achse berechnen (Abb.5).

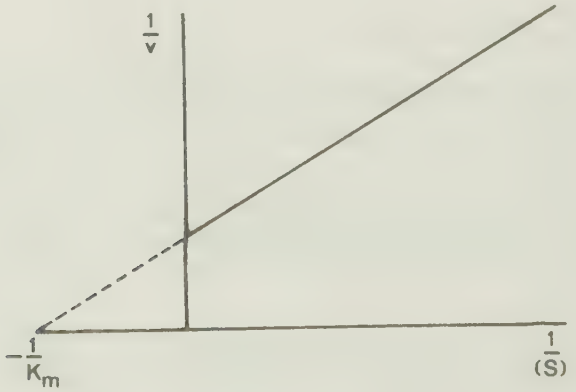



Abb.5

Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante

Die Verwendung sehr hoher Substratkonzentrationen mit dem Ziel möglichst hoher Reaktionsgeschwindigkeiten ist manchmal unpraktisch. Es kann bei großem Substratüberschuß zu einer Hemmung der Reaktion kommen, vermutlich weil mehrere Substratmoleküle sich am Enzymprotein anlagern und die Reaktion behindern. In diesem Fall nähert sich die Kurve im Lineweaver-Burk-Diagramm asymptotisch der y-Achse, d.h., die Werte für $\frac{1}{v}$ liegen nicht mehr auf der Geraden und dürfen nicht in die $K_m$-Bestimmung eingehen (Abb. 6).

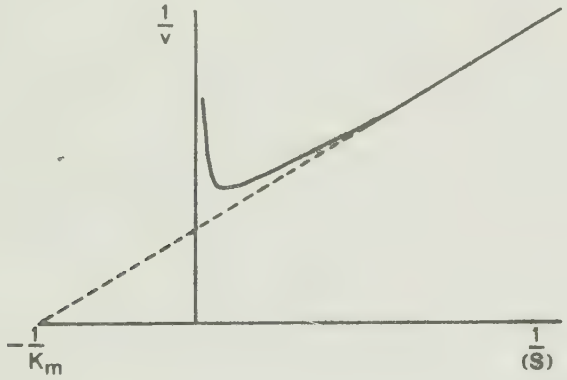



Abb. 6

Lineweaver-Burk-Diagramm mit Darstellung der Substrathemmung

Die Wahl der Substratkonzentration für eine Enzymreaktion richtet sich nach der Michaelis-Konstante. Wenn (S) wenigstens 10 mal größer ist als $K_m$, kann die Reaktionsgeschwindigkeit als unabhängig von der Substratkonzentration betrachtet werden (42). Jedoch kann der Spielraum für (S) durch Substrathemmung begrenzt sein, so daß die Forderung, (S) müsse wenigstens 10 mal größer sein als $K_m$, in einigen Fällen nicht erfüllt werden kann.

# IV. ERGEBNISSE

## 1. Stabilität

Temperaturen zwischen 4°C und 56°C:

Das Verhalten der Galaktokinase-Aktivität in Homogenisaten foetaler Organe wurde bei verschiedenen Temperaturen, die routinemäßig bei den Galaktokinase-Versuchen vorkamen, untersucht: Bei 4°C im Eisbad, bei 25°C, entsprechend einer durchschnittlichen Raumtemperatur, bei 37°C, entsprechend der Inkubationstemperatur und bei 56°C, einer Temperatur, bei der Enzyme erfahrungsgemäß denaturiert werden. Vor der eigentlichen Inkubation mit dem Reaktionsgemisch wurden 50 µl der verdünnten Homogenisate über eine bestimmte Zeitdauer "vorinkubiert" (0, 10, 30 und 60 Minuten). Anschließend wurde der Galaktokinase-Test durchgeführt und die Enzymaktivität bestimmt. Diese wurde mit der Aktivität der nach 0 Minuten inkubierten Probe, die 100% gleichgesetzt wurde, verglichen. Abb.7 zeigt die Abnahme der Enzymaktivität in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit.

Galaktokinase ist in foetalen Organen bei höheren Temperaturen instabil. Bei 4°C betrug der Aktivitätsverlust nach 60 Minuten bis zu 20%, bei 25°C bis zu 30%, bei 37°C bis zu 68%; bei 56°C war das Enzym bereits nach 30 Minuten vollständig denaturiert. Die Enzymaktivitäten in den verschiedenen Organen verhielten sich hinsichtlich ihrer Temperaturempfindlichkeit ähnlich, mit Ausnahme von Skelett- und Herzmuskel, in denen die Aktivität 60 Minuten lang bei 4°C und 25°C, im Herzmuskel auch bei 37°C stabil blieb. In der Leber nahm die Aktivität bei allen Temperaturen am meisten ab.

Aufbewahrung bei -20°C:

Die Aufbewahrung von Gewebshomogenisaten von foetalen Organen im tiefgefrorenen Zustand bei -20°C verursacht hohe Verluste an Galaktokinase-Aktivität (Abb.8). Bis zu 50% niedrigere Werte wurden nach einwöchiger, bis zu 75% niedrigere Werte nach zweiwöchiger Aufbewahrung bei -20°C gefunden. Nach dreiwöchiger Auf-

bewahrung bei -20°C war die Enzymaktivität um mindestens 40%, jedoch bis zu 80% vermindert. Als Vergleichswert diente diejenige Enzymaktivität, welche unmittelbar nach dem Homogenisieren der Gewebe im Enzymtest bestimmt worden war. Wie auch bei Temperaturen über 0°C war das Enzym in Skelettmuskel und Herzmuskel weniger instabil als in den übrigen Organen.

Einfluß von Einfrieren und Auftauen:

Der Einfluß plötzlicher Temperaturänderungen, wie Einfrieren und Auftauen, auf die Galaktokinase-Aktivität in Homogenisaten foetaler Organe wurde in einer Versuchsfolge parallel zu der vorhergehenden untersucht. Nach dem Homogenisieren der Gewebsproben wurden die Homogenisate in jeweils 4 Eppendorf-Gefäße abgefüllt. Drei davon ($H_1$, $H_2$ und $H_3$) wurden sofort tiefgefroren, mit dem 4. Homogenisat ($H_o$) wurde anschließend eine Enzymaktivitätsbestimmung vorgenommen, deren Ergebnis als Ausgangswert für Vergleiche 100% gleichgesetzt wurde. In Abb.8 zeigt die jeweils untere Kurve den Abfall der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Aufbewahrungsdauer bei -20°C bei dem Homogenisat $H_o$, das mehrmals eingefroren und aufgetaut worden war.

Als nach Ablauf einer Woche die Homogenisate $H_o$ und $H_1$ aufgetaut wurden, waren beide Proben je 1 mal eingefroren bzw. aufgetaut. Beim Enzymtest wurde in $H_o$ 3-18% weniger Aktivität als in $H_1$ bestimmt. Der Verlust läßt sich dadurch erklären, daß die Homogenisate $H_o$ am 1.Versuchstag während der Dauer des Enzymtests etwa 60 Minuten im Eisbad gestanden waren. Bei den nächsten Versuchen wurden die Homogenisate sofort nach dem Auftauen und Entnehmen der für den Enzymtest nötigen Menge wieder eingefroren.

Nach Ablauf der 2. Woche wurde die Aktivität in $H_o$ und $H_2$ bestimmt, wobei $H_o$ zum 2. Mal und $H_2$ zum 1. Mal eingefroren bzw. aufgetaut war. Die Aktivität betrug bei den verschiedenen Organen in $H_o$ 12-38% weniger als in $H_2$.

Nach Ablauf der 3. Woche wurde die Aktivität in $H_o$ und $H_3$ bestimmt, wobei $H_o$ zum 3. Mal und $H_3$ zum 1. Mal eingefroren bzw. aufgetaut war. Die Aktivität betrug bei den verschiedenen Organen in $H_o$ 15-55% weniger als in $H_3$. Das Enzym war insgesamt nach drei Wochen bei -20°C nach dreimaligem Einfrieren bzw. Auftauen ganz oder fast ganz inaktiviert.

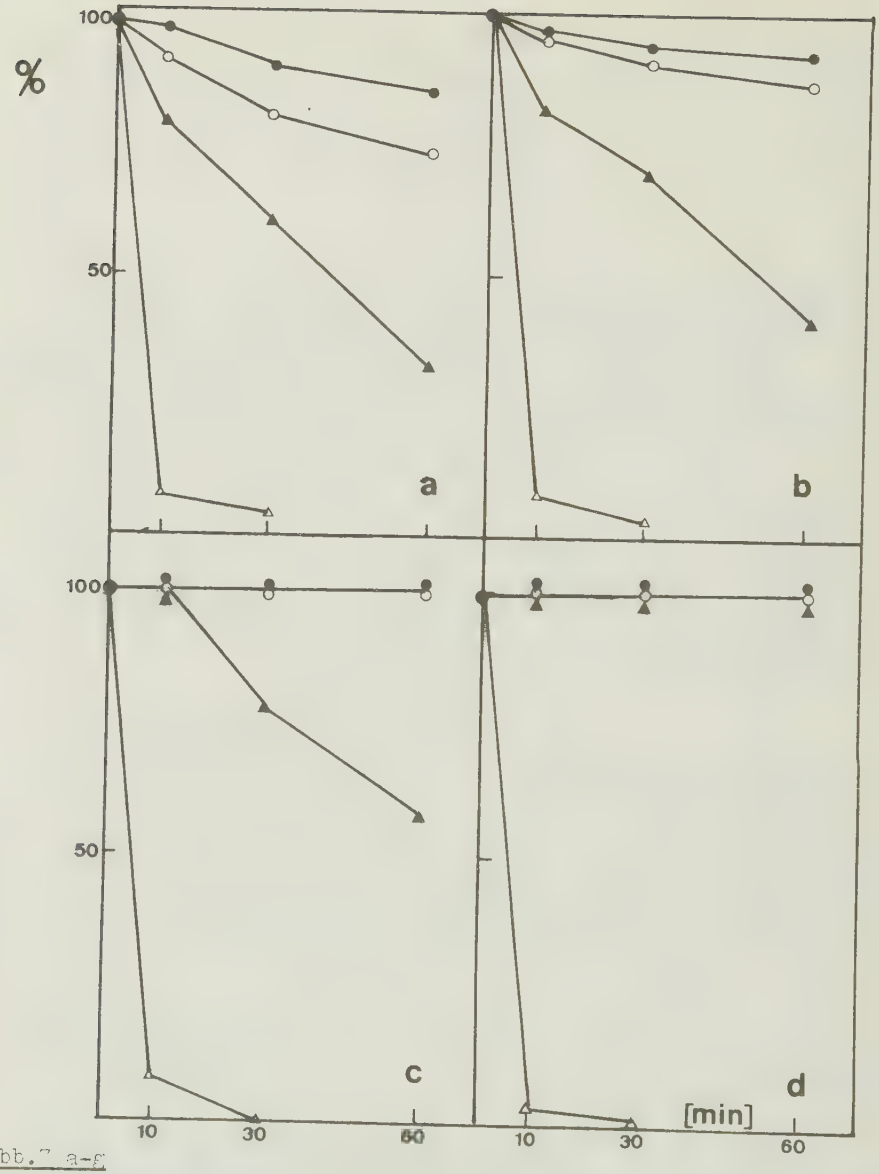
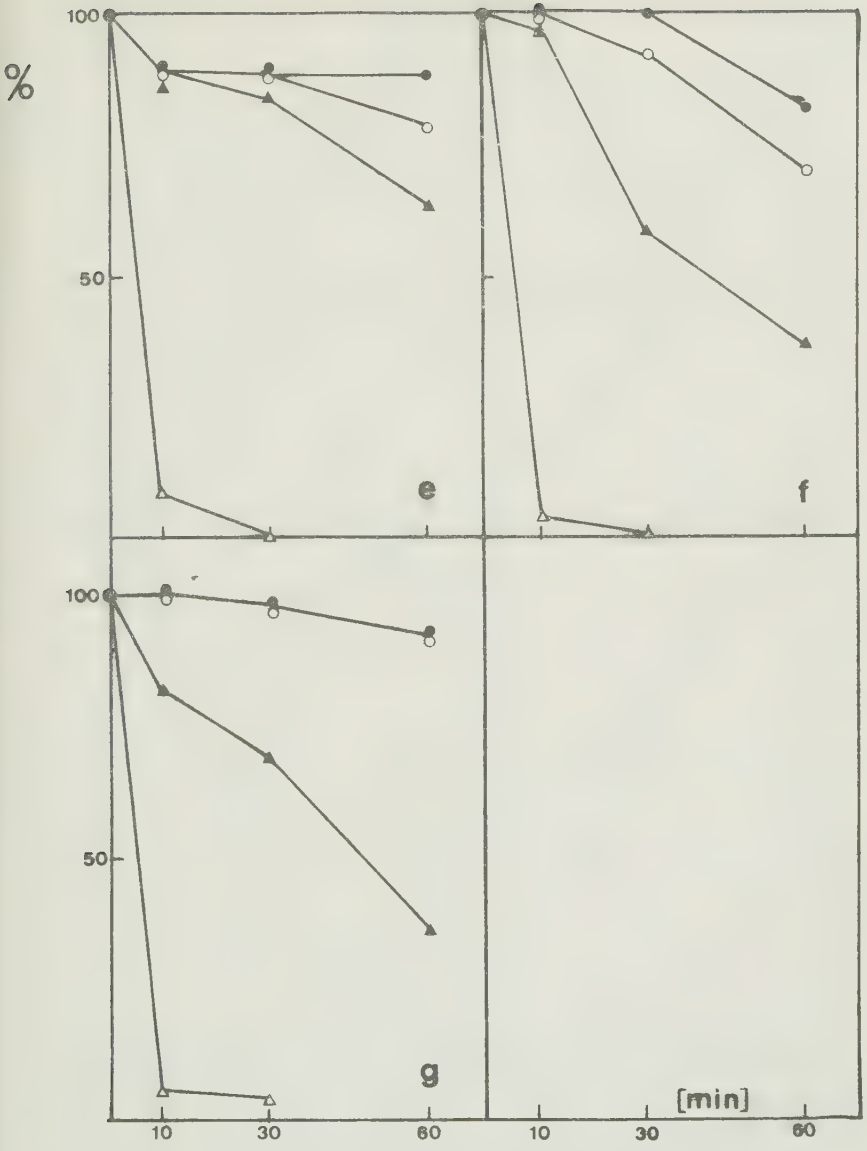



Abb. 7 a-g

Abnahme der Galaktokinase-Aktivität nach Vorinkubation bei verschiedenen Temperaturen in a) Leber, b) Lunge, c) Herzmuskel, d) Skelettmuskel, e) Milz, f) Niere und g) Hirn von Ratten.
(●—● 4°C, ○—○ 25°C, ▲—▲ 37°C, △—△ 56°C)


%
100
50
e
f
g
[min]
10
30
60

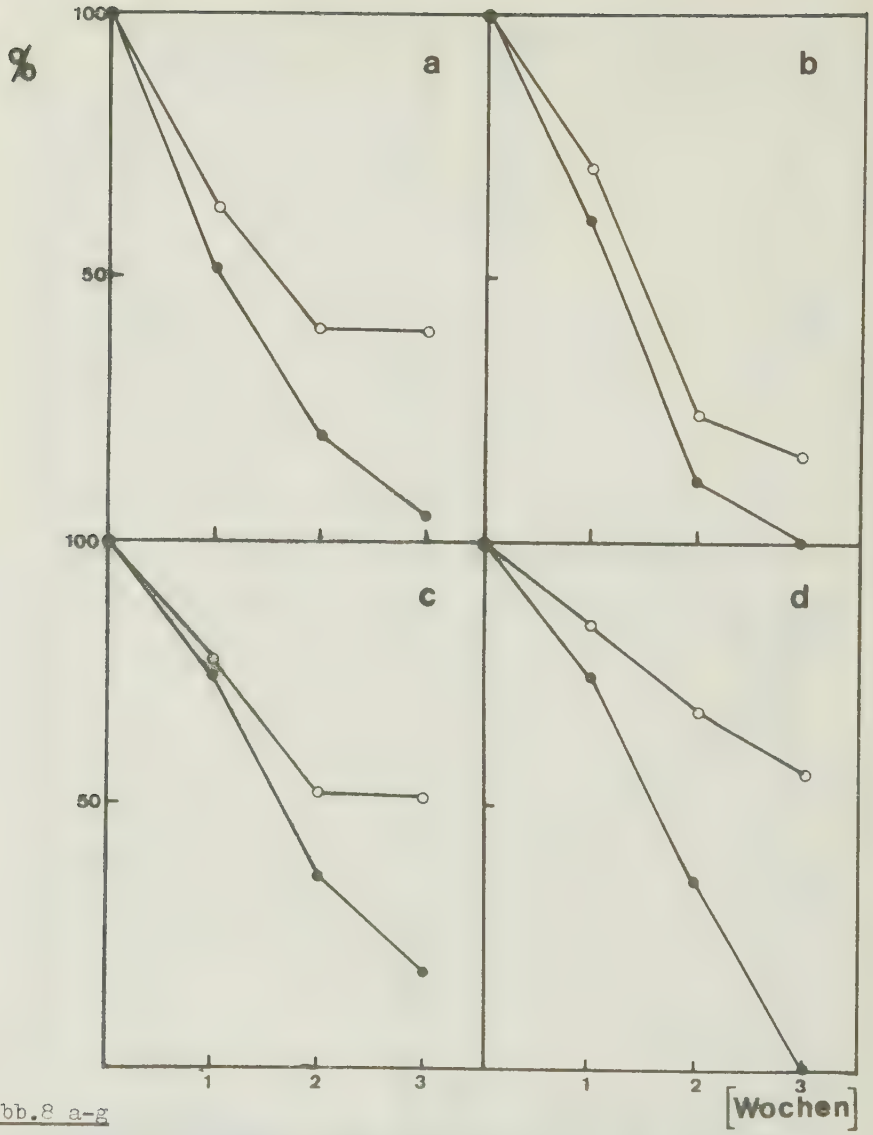
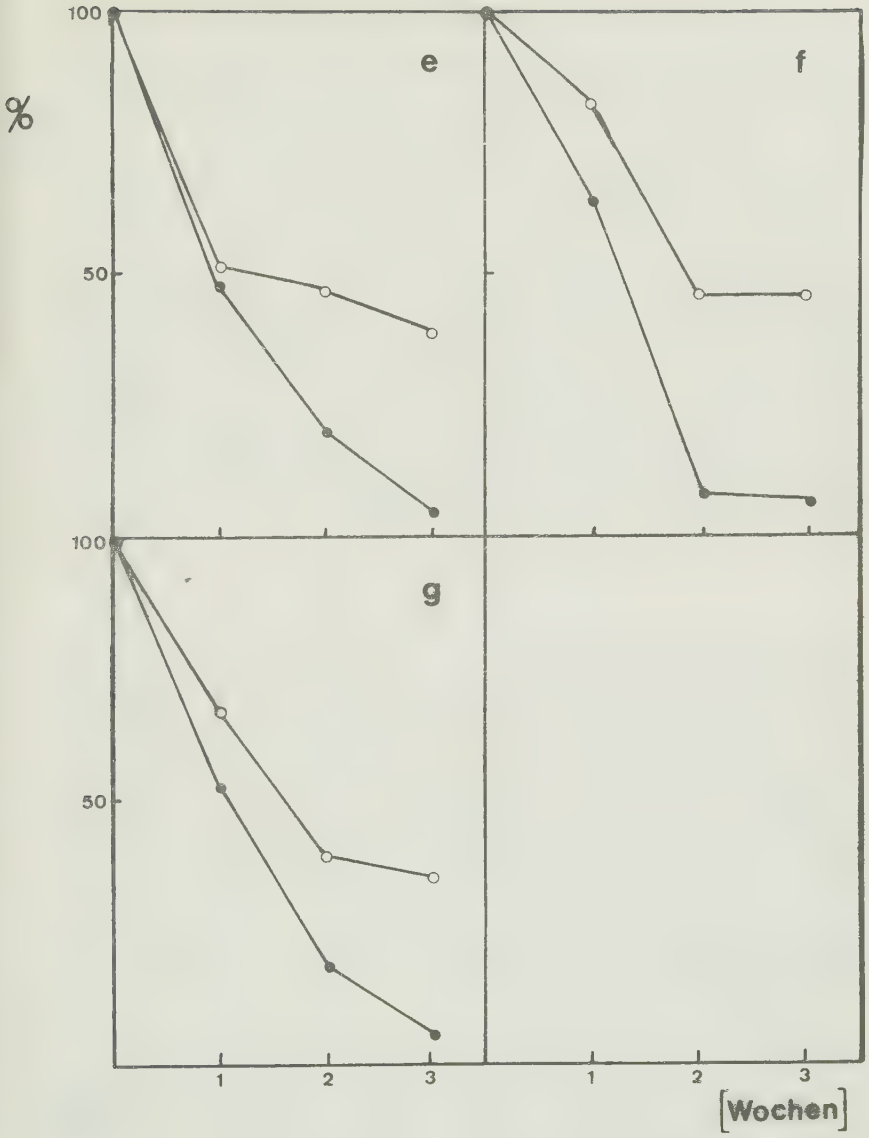



Abb.8 a-g

Abnahme der Galaktokinase-Aktivität nach Aufbewahrung der Homogenisate bei -20°C; o—o bei einmaligem Einfrieren und Auftauen nach 1 Woche ($H_1$), nach 2 Wochen ($H_2$) und nach 3 Wochen ($H_3$); •—• bei mehrmaligem Einfrieren und Auftauen des gleichen Homogenisats ($H_0$); a) Leber, b) Lunge, c) Herzmuskel, d) Skelettmuskel, e) Niere, f) Hirn und g) Milz eines Foeten (22.SSW).


%
100
50
e
f
100
50
g
1
2
3
1
2
3
[Wochen]

Bei zusammenfassender Betrachtung dieser Zahlen und der entsprechenden graphischen Darstellungen fällt bei allen Organen eine Vergrößerung der Spanne zwischen den beiden Kurven auf, die im Fall der 2. und der 3. Woche nicht mehr mit einem Aktivitätsverlust durch Wärmeexposition erklärt werden kann. Dieser zusätzliche Aktivitätsverlust könnte die Folge einer Inaktivierung des Enzyms beim Einfrieren bzw. Auftauen selbst sein.

Das bisher in unserem Labor praktizierte Verfahren der Vorbereitung von Homogenisaten zu einem beliebigen Zeitpunkt, der Aufbewahrung im Tiefkühlschrank über mehrere Wochen und der mehrmaligen Verwendung des gleichen Homogenisat-Gefäßes schien für die Galaktokinase ungünstig zu sein. Um Aktivitätsverluste durch Temperatureinwirkungen so weit wie möglich zu vermeiden, wurden bei den folgenden Versuchen die Gewebe unmittelbar vor der Weiterverwendung homogenisiert. Die Homogenisate wurden für einen Galaktokinase-Test nicht wiederverwendet.

## 2. Hemmung durch Chlorid-Ionen

Die Hemmung der Galaktokinase-Reaktion durch Chlorid-Ionen wurde in Leber, Lunge, Haut, Niere, Herz- und Skelettmuskel von Foeten untersucht. Durch Zugabe von NaCl bzw. KCl wurden im Inkubationsgemisch Chlorid-Ionen-Konzentrationen von 0.1 M, 0.2 M und 0.3 M eingestellt. Bei 0.1 M Chlorid war die Enzymaktivität um 10-30% vermindert, bei 0.2 M Chlorid um 25-40% und bei 0.3 M Chlorid um 35-60%. Die Hemmung war durch NaCl und KCl gleich stark, so daß die Chlorid-Ionen als Ursache angesehen werden können. Von der Hemmung waren alle Organe in etwa gleichem Ausmaß betroffen (Abb.9 a-f).

Bei der Säulenchromatographie der Galaktokinase, bei der 0.01 bis 0.3 M NaCl zur Elution verwendet wurde, wurden die Eluate mit $H_2O$ 1:1 verdünnt, so daß die Chlorid-Ionen-Konzentration durch 1:4 Verdünnung zwischen 0.0025 M und 0.075 M im Inkubationsgemisch lag.

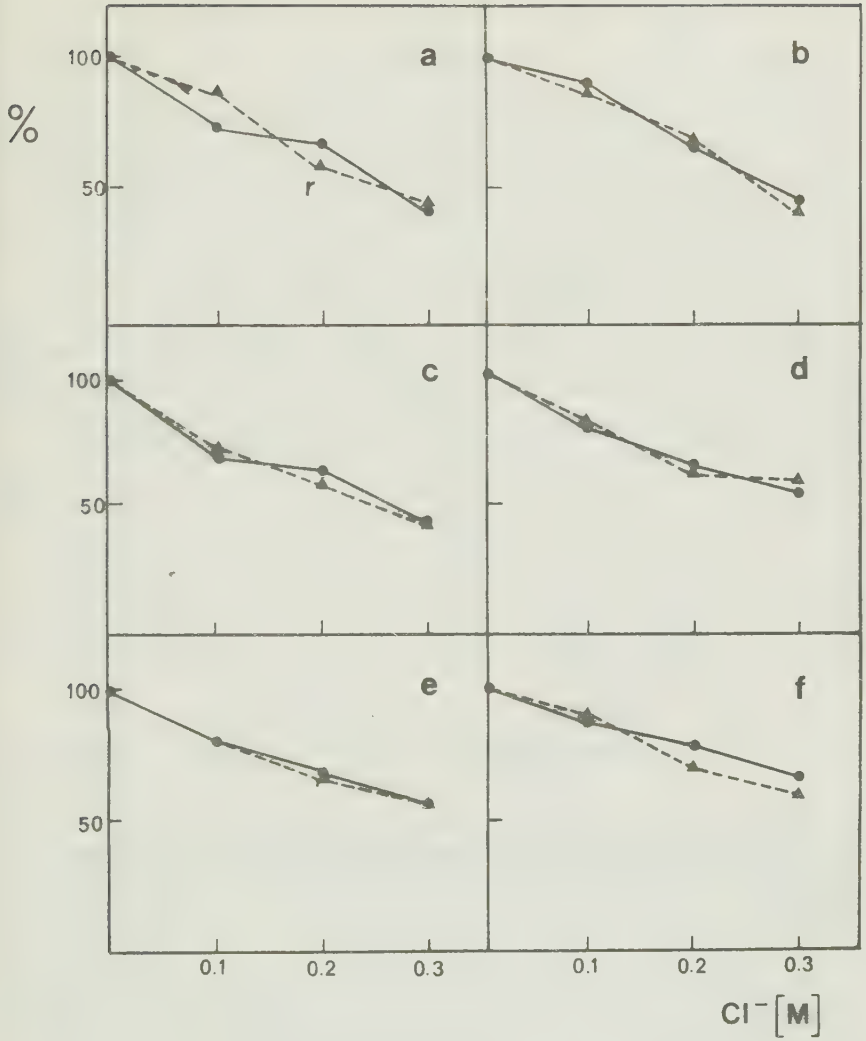



Abb.2 a-f

Abnahme der Kreatinkinase-Aktivität bei Anwesenheit von Chloridionen im Inkubationsgemisch in a) Leber, b) Niere, c) Skelettmuskel, d) Lunge, e) Herzmuskel und f) Hirn eines Foeten.

( ●—● NaCl, ▲---▲ KCl)

### 3. pH-Optimum

Bei der Bestimmung des pH-Optimums der Galaktokinase-Reaktion in foetalen Organen wurde die Enzymaktivität in Leber, Milz, Niere, Hirn und Skelettmuskel bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Dazu wurden im Reaktionsgemisch 100-mmolare Tris-HCl-Puffer verwendet, die mit 1 N HCl auf verschiedene pH-Werte titriert waren, die im Inkubationsgemisch bei pH 6.4, 6.9, 7.4, 7.9, 8.4 und 8.9 lagen.

Die Lage der pH-Optima und die Kurvenverläufe fielen unterschiedlich aus: Maximale Galaktokinase-Aktivität wurde bei allen Organen im Bereich zwischen pH 7.4 und pH 7.9 beobachtet; die Kurven hatten entweder einen Gipfel bei pH 7.4 bzw. bei pH 7.9 oder zwei Gipfel, mit dem Maximum bei pH 7.9 und mit einem zweiten, niedrigeren Gipfel bei pH 6.9 (Abb.10 a-d). In der Abbildung sind die pH-Optima der Galaktokinase in verschiedenen Organen, aufgegliedert nach dem Schwangerschaftsalter der Foeten, dargestellt. Eine Korrelation der pH-Optima mit den einzelnen Organen bzw. mit der Gestationszeit scheint nicht vorzuliegen.

### 4. Michaelis-Konstante für Galaktose

Die $K_m$-Werte der Galaktokinase für Galaktose, die in verschiedenen menschlichen Organen bestimmt wurden, sind in Tab.1 aufgeführt. Der Berechnung der Werte liegt das Lineweaver-Burk-Diagramm zugrunde, das für jede untersuchte Gewebsprobe angefertigt wurde. Abb.11 zeigt dafür ein Beispiel.

Die Michaelis-Konstanten für Galaktose lagen in Organen von Foeten zwischen 0.17 mM und 0.37 mM Galaktose bei 2 mM ATP. Insgesamt betrachtet, waren die $K_m$-Werte in Leber, Niere und Lunge etwas niedriger als in Hirn, Milz, Herz- und Skelettmuskel. Bei der Aufschlüsselung der Werte nach der Gestationszeit der Foeten, die zwischen 10 und 28 Schwangerschaftswochen betrug, waren keine wesentlichen Unterschiede vorhanden. Die Michaelis-Konstanten in drei Organen von Kindern bzw. Erwachsenen waren mit Werten zwischen 0.14 mM und 0.17 mM Galaktose, bei 2 mM ATP, etwas

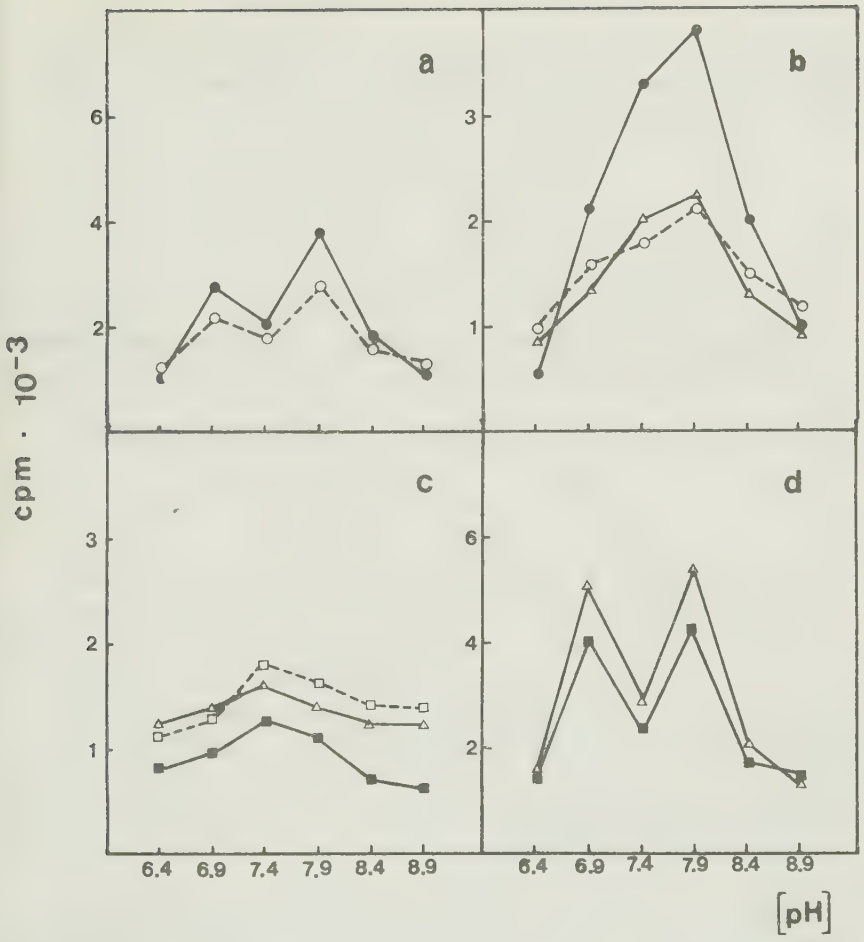



Abb.10 a-d

pH-Optimum für Galaktokinase in foetalen Organen bei verschiedenen Gestationszeiten [1], [2]

a) 10.SSW[1] (Leber ●—● , Hirn ○---○)
b) 16.SSW (Leber ●—● , Hirn ○---○, Milz △—△ )
c) 21.SSW (Skelettmuskel ■—■ , Niere □---□ , Milz △—△ )
d) 28.SSW (Skelettmuskel ■—■ , Milz △—△ )

---

1 Gestationszeit in Schwangerschaftswochen

2 pH-Werte im Inkubationsgemisch

Tabelle 1

Michaelis-Konstanten der Galaktokinase für Galaktose in Organen von Foeten und Erwachsenen[1]

| | Foeten | | | | | | Erw.[3] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Alter[2] | 10 | 21 | 21 | 22 | 25 | 28 | |
| Leber | | 0.18 | | 0.28 | 0.19 | 0.25 | 0.17 |
| Niere | 0.17 | | | 0.24 | 0.19 | | 0.15 |
| Lunge | | 0.26 | | | 0.23 | 0.16 | |
| Herz-muskel | | 0.23 | | 0.31 | 0.19 | | |
| Skelett-muskel | | 0.18 | 0.26 | 0.37 | | | 0.14 |
| Hirn | 0.22 | 0.28 | 0.29 | | | | |
| Milz | | | 0.33 | | 0.23 | | |

[1] $K_m$ in mM Galaktose bei 2 mM ATP

[2] Gestationszeit der Foeten in Schwangerschaftswochen

[3] genaues Alter unbekannt

niedriger als im Durchschnitt in foetalen Organen. In diesem Zusammenhang können Leber- und Nierenproben zweier Schulkinder den von Erwachsenen gleichgesetzt werden, da sich die spezifische Aktivität der Galaktokinase nach dem 3. bis 6. Lebensjahr auf Erwachsenenniveau eingependelt hat (45).

Hohe Galaktose-Konzentrationen im Inkubationsgemisch bewirkten eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit im Sinne einer Substrathemmung. Diese Hemmung trat in einigen Fällen ab 1.3 mM Galaktose, in der Mehrzahl der Fälle ab 2.7 mM Galaktose auf. Die Konzentration der Galaktose im Inkubationsgemisch war in den vorliegenden Versuchen 0.67 mM, d.h. etwa 2 bis 4 mal größer als die Michaelis-Konstante und außerhalb des Bereiches der Substrathemmung.

## 5. Michaelis-Konstante für ATP

Die Michaelis-Konstanten der Galaktokinase für ATP, die in verschiedenen menschlichen Organen bestimmt wurden, sind in Tab.2 aufgeführt. Der $K_m$-Wert wurde für jede Gewebsprobe aus einem Lineweaver-Burk-Diagramm bestimmt.

Die Michaelis-Konstanten für ATP lagen in den untersuchten Organen von Foeten zwischen 0.13 mM und 0.23 mM ATP bei 0.67 mM Galaktose. Etwas niedriger als in den anderen Organen war $K_m$ im Skelettmuskel, etwas höher im Hirn. Der $K_m$-Wert in der Leber eines Kindes war mit 0.10 mM ATP niedriger als in den untersuchten Gewebsproben von Foeten. Der $K_m$-Wert in der Niere eines Kindes war 0.17 mM und unterschied sich nicht von den $K_m$-Werten der untersuchten Nierenproben von Foeten.

## 6. Spezifische Aktivität

In Tab.3 ist die spezifische Aktivität der Galaktokinase in 7 Organen von 3 Embryos und 8 Foeten im Alter von 7 bis 28 Schwangerschaftswochen aufgeführt. In der Leber war die Aktivität mit Werten zwischen 0.72 und 11.95 Units am höchsten. In den parenchymatösen Organen Niere und Milz wurden Enzymaktivitäten

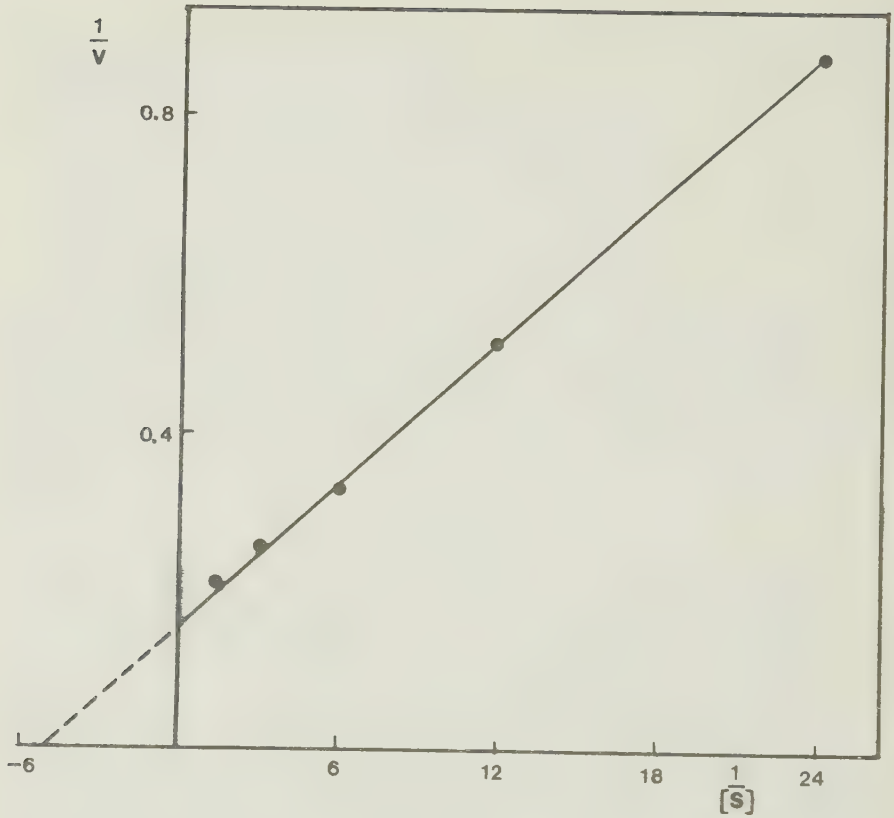



Abb.11

Michaelis-Konstante der Galaktokinase für Galaktose in der Leber eines Foeten (25.SSW).

Auftragung der reziproken Werte der Substratkonzentration (S) gegen die reziproken Werte der Reaktionsgeschwindigkeit (V) nach Lineweaver und Burk (41).

Tabelle 2

Michaelis-Konstanten der Galaktokinase für ATP in Organen von Foeten und Erwachsenen[1]

| | Foeten | | Erw.[3] |
|---|---|---|---|
| Alter[2] | 22 | 22 | |
| Leber | 0.16 | 0.20 | 0.10 |
| Niere | 0.18 | 0.20 | 0.17 |
| Lunge | 0.16 | 0.16 | |
| Herzmuskel | 0.16 | 0.18 | |
| Skelettmuskel | | 0.13 | |
| Hirn | 0.23 | | |
| Milz | 0.16 | 0.19 | |

[1] $K_m$ in mM ATP bei 0.67 mM Galaktose

[2] Gestationszeit der Foeten in Schwangerschaftswochen

[3] genaues Alter unbekannt

Tabelle 3

Spezifische Aktivität der Galaktokinase in foetalen Organen verschiedener Gestationszeiten [1]

| Probe | Alter | Leber | Niere | Milz | Herz-muskel | Skelett-muskel | Lunge | Hirn |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Foetus 1 | 7.SSW | 0.72 | | | | | | 0.15 |
| Foetus 2 | 10.SSW | 4.47 | 0.50 | | 0.12 | | 0.24 | 0.84 |
| Foetus 3 | 10.SSW | 5.40 | | | | | | 0.89 |
| Foetus 4 | 15.SSW | 3.44 | | | 1.39 | 1.01 | | 1.06 |
| Foetus 5 | 16.SSW | 4.76 | | 0.43 | | | | 0.48 |
| Foetus 6 | 21.SSW | 5.71 | 1.16 | 0.55 | 1.42 | 1.09 | 0.74 | 0.90 |
| Foetus 7 | 22.SSW | 3.51 | 2.50 | 2.10 | 1.05 | 0.39 | 1.22 | |
| Foetus 8 | 25.SSW | 11.95 | 2.25 | 1.49 | 0.81 | | 0.53 | |
| Foetus 9 | 26.SSW | 6.10 | | 3.66 | | | 1.14 | |
| Foetus 10 | 28.SSW | 11.54 | 1.38 | | 1.28 | 1.40 | 0.41 | |
| Foetus 11 | 28.SSW | | | 1.14 | | 0.90 | | |

[1] spezifische Aktivität in Units

bis zu 2.5 Units bzw. 3.66 Units bestimmt, während in den untersuchten Muskelorganen höchstens 1.42 Units bestimmt wurden. Die niedrigste spezifische Aktivität hatten Lungen- und Hirngewebe, in denen höchstens 1.22 Units bzw. 1.06 Units bestimmt wurden.

Ein Anstieg der spezifischen Aktivität ist andeutungsweise bei der Leber zu erkennen, jedoch reicht die Probenzahl zu einer genaueren Verlaufsbeobachtung nicht aus. In 6 Hirnproben war zwischen der 7. und der 21. Schwangerschaftswoche kein Anstieg der spezifischen Aktivität erkennbar. Bei den anderen Organen kann ein Anstieg nur vermutet werden; für die Bestätigung lagen zu wenige Zahlen vor.

## 7. Säulenchromatographie der Galaktokinase

Versuche zur chromatographischen Trennung der Galaktokinase in 22 Fraktionen wurden auf kleinen DEAE-Cellulose-Säulen mit den Homogenisaten 7 verschiedener foetaler Organe 3 bis 6 mal pro Organ durchgeführt.

Bei den Versuchen traten z.T. Schwierigkeiten auf, die anfangs mit der Erprobung verschiedener Pufferkonzentrationen zusammenhingen. Später wurde deutlich, daß ein entscheidendes methodisches Problem in der Instabilität der Galaktokinase während des Säulendurchlaufs liegt. Obwohl die Säulenlaufzeit mit $2^1/4$ bis $2^1/2$ Stunden so kurz wie möglich war und immer frische Gewebshomogenisate verwendet wurden, war die Aktivitätsausbeute in den Eluaten häufig unter 50%, so daß solche Versuche nicht ausgewertet werden konnten. In den Versuchen, von denen hier berichtet wird, war die Aktivitätsausbeute jeweils etwa 85%.

In Abb.13 a/b sind verschiedene Elutionsmuster der Leber-Galaktokinase dargestellt. Bei zwei Leberproben der 24. bzw. 26. Schwangerschaftswoche, die mit 0.01 M bis 0.3 M NaCl chromatographiert worden waren, wurde die Aktivität übereinstimmend in 2 Komponenten aufgetrennt gefunden. Diese 2 Gipfel waren relativ breit und lagen in der 7. bzw. in der 13. Fraktion. Bei zwei anderen Leberproben der 10. bzw. 16. Schwangerschaftswoche, die versuchsweise mit 0.01 bis 0.6 M NaCl chromatographiert worden waren, wurde nur ein - breiter - Gipfel in der 13. bzw. in der

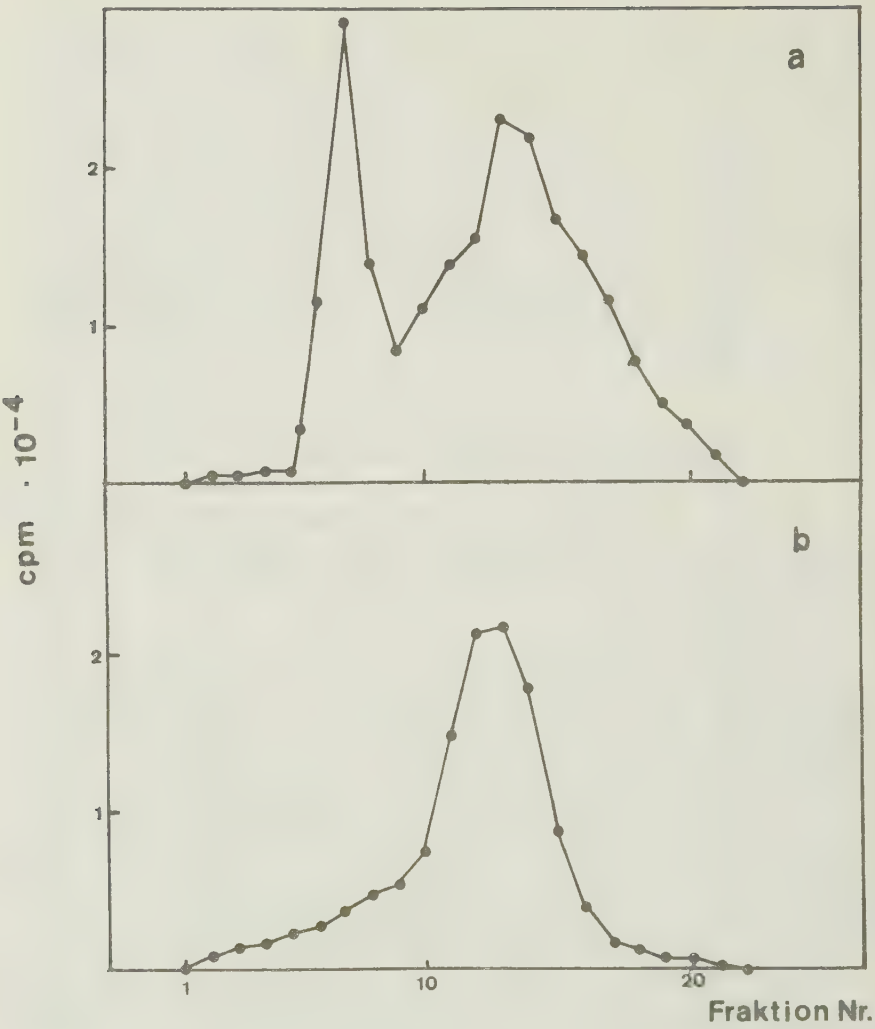



Abb.13 a-b

Säulenchromatographie der Galaktokinase in der Leber von zwei Foeten verschiedener Gestationszeit; Puffer: NaCl 0.01 - 0.3 M.

a) 26.Schwangerschaftswoche
b) 16.Schwangerschaftswoche

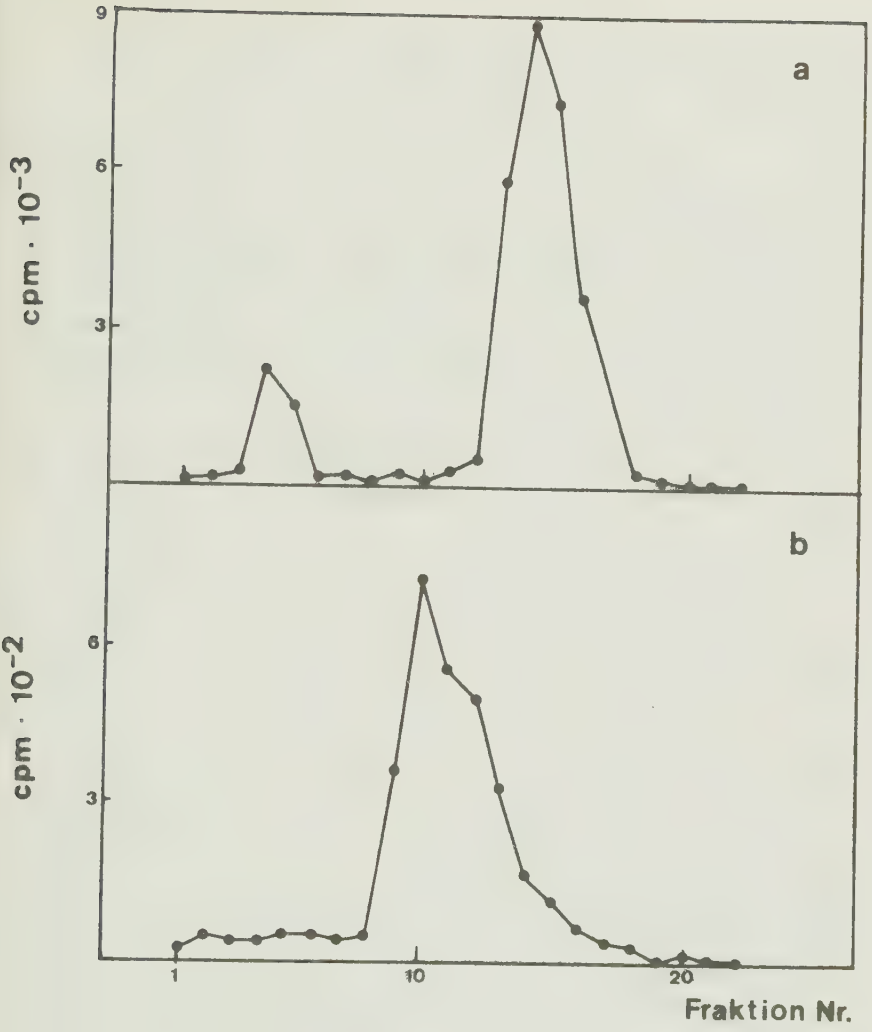



Abb.14 a-b

Säulenchromatographie der Galaktokinase in Lunge und Milz von Foeten; Puffer: NaCl 0.01 - 0.3 M.

a) Lunge (24. Schwangerschaftswoche)
b) Milz (26. Schwangerschaftswoche)

15. Fraktion festgestellt. Das Elutionsmuster einer Lungenprobe der 26. Schwangerschaftswoche ist in Abb.14 a dargestellt. Bei dieser Lungenprobe ließen sich 2 Gipfel, in der 4. und in der 14. Fraktion, feststellen. Die Aktivität des ersten Gipfels betrug etwa ein Viertel der Aktivität des zweiten Gipfels. Bei einer anderen Lungenprobe der 24. Schwangerschaftswoche kam nur ein Gipfel zur Darstellung, wie auch bei den Gewebsproben von Niere, Hirn, Herz- und Skelettmuskel, wobei die Gipfel in der 12. bis 15. Fraktion lagen. Auch die Chromatographie einer Milzprobe erbrachte einen einzigen Aktivitätsgipfel in der 10. Fraktion, in dessen Kurven verlauf jedoch eine kleine Schulter zum Vorschein kam, möglicherweise als Ausdruck eines zweiten, nahe am ersten Gipfel liegenden Gipfels (Abb.14 b).

## V. DISKUSSION

Stabilität:

Wenige der bisher veröffentlichten Arbeiten beschäftigten sich im Rahmen der Charakterisierung der Galaktokinase auch mit der Temperaturstabilität des Enzyms und seiner Stabilität bei der Aufbewahrung der Gewebe oder Homogenisate. Die dabei untersuchten Temperaturen und Zeiträume waren zudem uneinheitlich, so daß nur indirekte Vergleiche mit dieser Arbeit angestellt werden können.

Cuatrecasas und Segal (23) untersuchten in Leberhomogenisaten neugeborener und erwachsener Ratten den Aktivitätsverlust, der nach 24-stündiger Aufbewahrung bei 10°C auftrat. Sie fanden in der Leber der neugeborenen Ratten 27% Verlust, in der Leber der erwachsenen Ratten jedoch 62% Verlust an Aktivität. Dieser Stabilitätsunterschied trug zusammen mit anderen Ergebnissen über unterschiedliches kinetisches Verhalten der Galaktokinase zu der Vermutung der Autoren bei, es gäbe mindestens zwei altersspezifische Galaktokinasen. Dieser Gesichtspunkt soll in einem späteren Abschnitt näher erläutert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Galaktokinase-Stabilität unter anderem in der Leber von Foeten untersucht und es wurde nach einer Stunde bei 4°C 16% Aktivitätsverlust gemessen. Wenn man den Unterschied von Art und Alter der Probanden außer acht läßt, so ergibt sich im Vergleich für die Leber der neugeborenen Ratte mit etwa 1% pro Stunde bei 10°C ein wesentlich geringerer Aktivitätsverlust als für die Leber des menschlichen Foeten mit 16% Verlust pro Stunde bei nur 4°C.

Chacko et al. (31) wählten für einen Stabilitätsversuch in menschlichen Fibroblasten 47°C, eine Temperatur, die 10° über der Inkubationstemperatur von 37°C lag. Sie stellten nach 10 Minuten Vorinkubation bei 47°C eine Aktivitätsabnahme von 60% fest. In den verschiedenen hier untersuchten Organen von Foeten war nach 10 Minuten Vorinkubation bei 37°C entweder noch alle Aktivität erhalten oder höchstens 22% davon verschwunden. Bei 56°C

war bei sonst gleichen Versuchsbedingungen entweder keine Aktivität mehr vorhanden oder höchstens 9% davon. Da anzunahmen ist, daß die Beziehung zwischen Zeit und Temperatur nicht linear ist, kann man zwischen 37°C, 47°C und 56°C nicht interpolieren. Trotzdem erscheint dem Betrachter, als sei die Galaktokinase in foetalen Organen ähnlich hitzeempfindlich wie das Enzym in den Fibroblasten Erwachsener.

Die Aufbewahrung von versuchsbereitem, homogenisiertem Gewebe bzw. hämolysiertem Blut im tiefgefrorenen Zustand über längere Zeit ist eine bei vielen Enzymbestimmungen geläufige, arbeitserleichternde Handhabung. Sie ist jedoch nur für Enzyme zulässig, die dabei nicht oder nur geringfügig an Aktivität verlieren.

Sherman und Adler (22) bewahrten die von ihnen mehrfach gereinigte Galaktokinase aus E.coli nach Ausfällung mit Ammoniumsulfat mehrere Monate bei -20°C mit nur geringem Aktivitätsverlust auf. Gulbinsky und Cleland (36) stellten, ebenfalls bei gereinigter E.coli-Galaktokinase, über 7 Monate bei -10°C keinerlei Aktivitätsverlust fest, nicht einmal dann, wenn das Enzym mehrmals eingefroren und aufgetaut wurde. Bei Schell und Wilson (28) blieb das Enzym in Nativzellen des Hefepilzes Saccharomyces cerevisiae über 3 Monate bei -20°C stabil.

Das ungereinigte Enzymprotein scheint bei der Ratte und beim Menschen empfindlicher zu sein, was auch die Stabilitätsversuche von Ng et al. (20) in ihrer Arbeit über die Galaktokinase in Erythrozyten Erwachsener zeigen: Der Aktivitätsverlust im Homogenisat betrug bei -20°C nach 1 Tag 20% und nach 6 Tagen 90%. In der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem nach 7 Tagen bei -20°C die Galaktokinase-Aktivität in foetalen Organen bestimmt. Der Aktivitätsverlust war mit 16% bis 48% geringer als bei den Erythrozyten, die 90% ihrer Aktivität verloren hatten. Während in dieser Arbeit Tris-HCl-Puffer bei pH 8.0 verwendet wurde, hatten Ng et al. mit Tris-HCl-Puffer bei pH 7.0 gearbeitet; angesichts des nicht fest definierten pH-Einflusses auf die Galaktokinase-Aktivität kann der Unterschied des Aktivitätsverlustes bei Erythrozyten von Erwachsenen und foetalen Organen nicht verglichen werden.

Die Aufbewahrung von noch nicht homogenisiertem bzw. hämolysiertem Gewebe bzw. Blut verursacht wahrscheinlich geringere Aktivitätsverluste. Shin-Bühring et al. (27) beschrieben die Galaktokinase in Erythrozyten im Vollblut als stabil nach 10 Tagen bei 4°C. Bei foetalen Organen wurde im Rahmen dieser Arbeit bemerkt, daß in dem Material bereits nach einem Tag bei 4°C keine Galaktokinase-Aktivität mehr enthalten war. Bei Gewebe, das als Ganzes bei -20°C tiefgefroren war, wurde dagegen ein geringer Aktivitätsverlust bemerkt, genaue Untersuchungen darüber jedoch nicht angestellt.

Im Rahmen der Stabilitätsuntersuchungen wurden auch Versuche mit Homogenisaten durchgeführt, die nicht nur mehrere Wochen bei -20°C aufbewahrt worden waren, sondern die mehrmals aufgetaut, für den Galaktokinase-Test verwendet und wieder eingefroren worden waren. Dabei fiel ein zusätzlicher Aktivitätsverlust auf im Vergleich mit den ebenfalls bei -20°C aufbewahrten, aber nicht mehrmals eingefrorenen und aufgetauten Homogenisaten. In der Leber eines Foeten z.B. war in der 2 mal eingefrorenen bzw. aufgetauten Probe 20% weniger Enzymaktivität enthalten als in der nur einmal so behandelten Probe; in der 3 mal so behandelten Probe war 35% weniger Aktivität enthalten als in der Vergleichsprobe. Daraus kann gefolgert werden, daß allein der Vorgang des Einfrierens bzw. Auftauens nicht unwesentliche Aktivitätsverluste bei der Galaktokinase verursacht.

Es wäre interessant zu wissen, wie diese Inaktivierung vor sich geht. Durch das Homogenisieren des Gewebes vor dem Einfrieren ist das Enzym nicht mehr durch die Zellwand geschützt. Wird es nun bei der Änderung des Aggregatzustandes durch mechanische Kräfte verändert? Werden Untereinheiten abgesprengt oder Aminosäurebrücken zerstört? Vor der Beantwortung solcher Detailfragen wäre zunächst die Aufklärung der Struktur des Enzyms von größter Bedeutung.

Vergleicht man die Aktivitätsverluste, die bei den vorliegenden Untersuchungen in den verschiedenen foetalen Organen auftraten, miteinander, so fallen einige Unterschiede auf: Nach 60 Minuten Vorinkubation sowohl bei 4°C als auch bei 25°C hatte sich die Enzymaktivität in Herz- und Skelettmuskel nicht verändert, während sie in Leber und Niere um etwa 16% bis 30% abge-

nommen hatte. In Skelettmuskel war sogar nach 60 Minuten bei 37°C die Aktivität unverändert, während sie in Leber und Niere etwa 60% abgenommen hatte. Nach einer Woche Aufbewahrung bei -20°C betrug der Aktivitätsverlust in Herz- und Skelettmuskel etwa 20%, in Leber und Niere aber etwa 40-50%.

Auf Grund unzureichender Erkenntnisse über die Galaktokinase in den verschiedenen menschlichen, insbesondere in den foetalen Organen, ist es schwierig, die an nur jeweils einem Foeten beobachteten Unterschiede zu interpretieren. Das gleiche Enzym könnte sich im gleichen Gewebe eines anderen Foeten anders gegenüber Hitze und Kälte verhalten. Es fällt auf, daß die Muskelorgane , deren spezifische Aktivität niedrig war, Temperatureinflüssen mehr Stabilität entgegensetzten als die parenchymatösen Organe Leber und Niere, deren spezifische Aktivität 6 mal bzw. um die Hälfte höher war. Dies muß nicht von Bedeutung sein, solange nicht entsprechende Organunterschiede bei anderen Eigenschaften des Enzyms gefunden werden. Dann allerdings könnten solche Beobachtungen zur Beschreibung von Isoenzymen beitragen.

Als praktische Konsequenz der Ergebnisse über die Stabilität können folgende Empfehlungen für die Arbeit mit Galaktokinase formuliert werden:

1. Foetale Gewebe sollten nach Möglichkeit frisch sein, können whrscheinlich auch als Ganzes tiefgeroren aufbewahrt werden. Die Gewebshomogenisate sollten nicht verwendet werden, wenn sie vorher eingefroren waren.

2. Die Gewebsproben sollten vorsichtig aufgetaut und im Eis homogenisiert werden. Sie sollten unmittelbar danach verwendet werden. Die Verdünnung der Homogenisate sollte bei der Vorbereitung des Enzymtests als letzter Arbeitsgang stattfinden, da verdünnte Lösungen instabiler sind als konzentrierte (43).

Hemmung durch Chlorid-Ionen:

Die Hemmbarkeit der Galaktokinase durch verschiedene Substanzen kann als ein weiteres Charakteristikum des Enzyms betrachtet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hemmung der Galaktokinase durch Chlorid-Ionen und durch die Substrate Galaktose und ATPbeschrieben. Die Substrathemmung wird im Zusammenhang mit den Michaelis-Konstanten diskutiert.

Obwohl viele Autoren Tris-HCl- und NaCl-Puffer beim Galaktokinase-Test verwendeten, wurde die Hemmbarkeit des Enzyms durch diese Substanzen nie untersucht. Die Frage, ob es durch Chlorid-Ionen gehemmt werden kann und in welchem Ausmaß, war aus zwei Gründen von Interesse: 1) Das Inkubationsgemisch enthält als Puffer 0.133 M Tris-HCl, worin allerdings nur eine geringe Konzentration an freien Chlorid-Ionen enthalten ist. 2) Bei der Säulenchromatographie der Galaktokinase wurden die Fraktionen des Enzyms mit NaCl-Puffer von 0.01 M bis 0.3 M ausgewaschen. wobei hier eine höhere Konzentration an Chlorid-Ionen enthalten ist.

Ad 1) Bei den Versuchen zur Bestimmung des pH-Optimums für Galaktokinase mit Tris-HCl pH 8.0, das mit 1 N HCl auf pH-Werte zwischen 6.4 und pH 8.9 titriert war, wurden im niedrigeren pH-Bereich größere HCl-Mengen zugegeben, so daß die Enzymaktivität mehr gehemmt wurde als im oberen pH-Bereich. Alle anderen Versuche wurden bei pH 7.9 im Inkubationsgemisch durchgeführt, wobei der 0.133 molare Tris-HCl-Puffer nur etwa 10% der Molarität an freiem Chlorid enthielt, also etwa 0.013 M.

Ad 2) Der bis zu 0.3 molare NaCl-Puffer, der sich bei der Säulenchromatographie der Galaktokinase nach der Elution in den Fraktionen befand, hemmte die Galaktokinase im Enzymtest. In gesonderten Versuchen mit NaCl und KCl war bei foetalen Organen eine Hemmung des Enzyms durch Chlorid-Ionen festgestellt worden, wobei eine im Inkubationsgemisch 0.1 molare Chlorid-Konzentration bis zu 30% Aktivitätsverlust verursachte. Um diese Chlorid-Hemmung zu verringern, wurden die Säuleneluate im Inkubationsgemisch 1:4 verdünnt, so daß die letzte, mit 0.3 M NaCl eluierte Fraktion noch höchstens 0.075 M NaCl enthielt und alle anderen Fraktionen unter 0.075 M NaCl.

pH-Optimum:

Über den optimalen pH-Wert für den Galaktokinase-Test ist in zahlreichen Veröffentlichungen berichtet worden. Die Bestimmung des pH-Optimums wurde einerseits häufig wegen der Bedeutung der optimalen Reaktionsbedingungen für die eigenen Versuche durchgeführt, andererseits erhofften sich einige Autoren durch vergleichende pH-Studien Aufschluß über etwaige Isoenzymmuster.

Das pH-Optimum der Galaktokinase wurde sowohl in Bakterien und Hefepilzen, als auch in menschlichen Zellen und Geweben von Foeten bestimmt, nämlich in Amnionzellen und Erythrozyten und in der Leber. Zum Vergleich mit den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen über pH-Optima in foetalen Organen dient eine zusammenfassende Übersicht in Tab.4.

In nicht-menschlichen Organismen wie E.coli und S.cerevisiae (22, 28), wurden mit pH 8.0 bis pH 9.0 etwas höhere pH-Optima als in menschlichen Organismen gefunden.

Öfter als in anderen Zellen wurde das pH-Optimum in kultivierten menschlichen Fibroblasten untersucht. Fibroblasten besitzen nach Tedesco und Mellmann (30) eine 3 mal höhere Aktivität als Leukozyten und werden häufig in der klinischen Diagnostik des Galaktokinase-Mangels untersucht. Die Autoren fanden zwischen pH 7.5 und pH 8.2 variierende Optima, die offensichtlich nicht von der Höhe der verwendeten Tris-HCl-Konzentrationen abhängen. Hill (32) untersuchte den Effekt des pH-Wertes auf die Galaktose-Aufnahme kultivierter menschlicher Fibroblasten. Bei gesunden Personen kann als wahrscheinlich angenommen werden, daß die Aufnahme von Galaktose in die Zelle proportional der Phosphorylierung durch die Galaktokinase ist, also der Enzymaktivität entspricht. Die Autorin fand eine biphasische Kurve mit einem Gipfel bei pH 7.0 und einem zweiten Gipfel bei pH 8.5. Auf Grund von Vergleichen mit den in der Literatur beschriebenen pH-Optima bezog sie den ersten Gipfel auf die Galaktokinase und den zweiten auf die Transferase. Ein interessanter Aspekt, obwohl nicht Gegenstand dieser Arbeit, soll trotzdem kurz erwähnt werden: Hills pH-Optimum für Galaktokinase bei pH 7.0 ist niedriger als die meisten für Fibroblasten beschriebenen Werte. Möglicherweise sind pH-Optima in Fibroblasten, die, unter in-vivo-Bedingungen

Tabelle 4

pH-Optima der Galaktokinase von verschiedenen Autoren[1]

| | pH | mM Tris-HCl |
|---|---|---|
| E.coli (22) | 8.0 | 100 |
| S.cerevisiae (28) | 8.0-9.0 | 100 |
| Fibroblasten (18) | 7.8-8.2 | 150 |
| Fibroblasten (30) | 7.5 | 200 |
| Fibroblasten (31) | 7.8 | 100 |
| Fibroblasten (32) | 7.0 | 75 |
| Fibroblasten (33) | 7.9 | 250 |
| Leukozyten (30) | 7.5 | 200 |
| Leukozyten (33) | 7.4 (8.0)[2] | 250 |
| Erythrozyten Foetus (27) | 7.7 | 200 |
| Erythrozyten Neugeb. (27) | 7.7-7.9 | 200 |
| Erythrozyten Kinder (27) | 7.7-7.9 | 200 |
| Erythrozyten Erwachs. (27) | 7.7 | 200 |
| Amnionzellen Foetus (33) | 7.9 | 250 |
| Leber Foetus (35) | 7.9 | 200 |
| Leber Foetus (diese Arbeit) | 7.9 (6.9)[2] | 133 |
| Niere Foetus ( " ) | 7.4 | 133 |
| Milz Foetus ( " ) | 7.4-7.9 (6.9)[2] | 133 |
| Skelettmuskel ( " ) | 7.4-7.9 (6.9)[2] | 133 |

[1] pH-Werte und Tris-HCl-Konzentrationen im Inkubationsgemisch

[2] in Klammern: Lage eines zweiten, submaximalen Gipfels

kultiviert, untersucht werden, generell niedriger als pH-Optima von Zellen und Geweben, die in vitro untersucht werden.

Tedesco und Mellmann (30) fanden in Leukozyten ein pH-Optimum bei 7.5, Shin-Bühring et al. (33) bei pH 7.4 mit einem zweiten, niedrigeren Gipfel bei pH 8.0. Diese Ergebnisse sind aus zwei Gründen interessant: Erstens waren in der vorliegenden Arbeit in Niere, Milz und Skelettmuskel eines Foeten ebenfalls niedrige pH-Optima bei pH 7.4 aufgetreten. Zweitens zeigten sich in Leber, Milz, Skelettmuskel und Hirn wiederholt biphasische pH-Kurven, wobei der höhere Gipfel allerdings bei pH 7.9 lag. Laut Shin-Bühring et al. könnte der 2. Gipfel bei ihnen vielleicht auf mitreagierende Lymphozyten im Leukozyten-Hämolysat zurückgeführt werden. Die Homogenisate der hier untersuchten foetalen Organe müßten eigentlich homogen sein, so daß für dieses Phänomen eine andere Erklärung gesucht werden muß.

Das von Shin-Bühring et al. (35) in der Leber von Foeten bestimmte Optimum bei pH 7.9 stimmt mit dem in dieser Arbeit überein. Allerdings zeigen die beiden Kurven für Leber in dieser Arbeit einmal einen monophasischen und einmal einen biphasischen Verlauf. In einer anderen Arbeit von Shin-Bühring et al. (27) war das pH-Optimum in den Erythrozyten eines Foeten und eines Erwachsenen bei pH 7.7, während es bei Neugeborenen und Kindern bei pH 7.9 lag und in einigen Fällen eine "Schulter" mit hoher Aktivität bei pH 7.4 gefunden wurde. Biphasische Kurvenverläufe wurden in der vorliegenden Arbeit nicht nur in der Leber, sondern auch zum Teil in Hirn, Milz und Skelettmuskel festgestellt. Vergleichswerte anderer Autoren für diese Organe sind jedoch nicht bekannt. Es kann auf Grund der hier vorliegenden geringen Versuchszahl pro Organ bei vier Foeten verschiedener Gestationszeit lediglich vermutet werden, daß die hier unterschiedlichen pH-Optima nicht von der Art des Gewebes oder von der Gestationszeit abhängen. Vielmehr könnten diese Variationen allgemein ein Ausdruck der Verschiedenheit der Individuen, bzw. speziell der hier untersuchten Foeten sein. Für die Erklärung der inkonstanten biphasischen Kurven wäre es interessant, zu wissen, ob es in den Geweben von Individuen unterschiedliche Pufferkapazitäten gibt, und ob das Enzym mehrere Bindungsstellen besitzt, die bei verschiedenen pH-Bedingungen mehr oder weniger aktiviert sein könnten.

In dieser Arbeit wurde an anderer Stelle eine Hemmung der Galaktokinase-Reaktion durch Chlorid-Ionen beschrieben. In diesem Zusammenhang könnte die wechselnde Lage der pH-Optima bei pH 7.4 oder pH 7.9 mit der Verwendung von Tris-HCl-Puffer erklärt werden. Im Inkubationsgemisch mit dem niedrigeren pH-Wert sind mehr Chlorid-Ionen enthalten, was niedrigere Enzymaktivität zur Folge haben kann. Die Bedeutung, die der Art und Konzentration des Puffers zukommt, zeichnet sich auch in nicht veröffentlichten Studien in unserem Labor ab: Die Verwendung von Tris-Mal at-Puffer statt Tris-HCl-Puffer ergab nicht nur eine um 10% höhere Aktivität, sondern nur ein pH-Optimum an Stelle von zwei pH-Optima, die früher von Shin-Bühring et al. (27) in der Galaktokinase von Erythrozyten beschrieben worden waren.

Michaelis-Konstanten für Galaktose und ATP:

Die Michaelis-Konstanten der Galaktokinase für ihre beiden Substrate wufden bisher in sehr unterschiedlichen Organismen, nämlich in Bakterien und Hefepilzen, in menschlichen Haut-und Blutzellen, in der Leber von Ratten und Schweinen und in menschlicher Leber untersucht. Es wurde dabei unter verschiedenen Versuchsbedingungen gearbeitet, die den Vergleich der Ergebnisse erschweren (Tab.5).

Bei der Bestimmung der $K_m$ für Galaktose enthielt das Inkubationsgemisch bei den aufgeführten Autoren zwischen 0.6 mM und 5 mM ATP. Tedesco und Mellmann (30) verwendeten z.B. 0.6 mM ATP, obwohl sie in Leukozyten $K_m$ bei 0.52 mM ATP bestimmt hatten. Das würde bedeuten, daß das Enzym bei den Versuchen nur etwa bis zur Hälfte mit ATP gesättigt gewesen wäre. Cuatrecasas und Segal (23) verwendeten z.B. 6 mM ATP, das 50-fache der $K_m$, die sie für ATP besti mt hatten. In der vorliegenden Arbeit war die ATP-Konzentration 2 mM und damit 10-20 mal größer als die Michaelis-Konstante für ATP.

Die in der Tabelle aufgeführten Autoren verwendeten bei der Bestimmung der $K_m$ für ATP Galaktose-Konzentrationen zwischen 0.4 mM und 3 mM Galaktose im Inkubationsgemisch. Bei Cuatrecasas und Segal (23) war die Galaktose-Konzentration z.B. 0.4 mM, obwohl sie in der Leber von foetalen Ratten einen $K_m$-Wert von 0.9 mM bestimmten. Es war bei ihnen aber ab 0.4 mM Galaktose

Tabelle 5

Michaelis-Konstanten der Galaktokinase für Galaktose und ATP bei verschiedenen Autoren unter Berücksichtigung der Reaktionsbedingungen

| | | Galaktose | | ATP | | Puffer |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Material[1] | Autoren | $K_m$ (mM) | ATP (mM) | $K_m$ (mM) | Gal (mM) | pH |
| E.coli | Sherman und Adler (22) | 0.70 | | 0.10 | | 7.8 |
| S.cerevisiae | Schell und Wilson (28) | 0.60 | 0.75 | 0.15 | 3.0 | 8.0 |
| Fibroblasten | Tedesco und Mellmann (30) | 0.18-0.40 | 0.6 | 0.2 | 0.4 | 7.6 |
| Fibroblasten | Chacko et al. (31) | 0.2-1.0 | 1.5 | 0.03-0.30 | 1.0 | 7.8 |
| Fibroblasten | Shin-Bühring et al. (33) | 0.48 | 2.0 | 2.1 | 1.0 | 8.0 |
| Leukozyten | Tedesco und Mellmann (30) | 0.17 | 0.6 | 0.52 | 0.4 | 7.6 |
| Ery. Neugeb. | Mathai und Beutler (24) | 0.23 | 6.0 | | | 7.4 |
| Ery. Erwachs. | | 0.14 | | | | |
| Ery. Erwachs. | Blume und Beutler (34) | 0.10-0.15 | | 0.2-0.5 | | 7.7-7.9 |
| Ery. Foetus | | 0.40 | | | | |
| Ery. Neugeb. | Shin-Bühring et al. (27) | 0.32 | 5.0 | | | 8.0 |
| Ery. Säugling | | 0.21 | | | | |
| Ery. Erwachs. | | 0.16-0.17 | | | | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Amnionz. Foet. | Shin-Bühring et al. (33) | 0.34 | 2.0 | 1.25 | 1.0 | 3.0 |
| Leber Schwein | Ballard (29) | 0.1-0.3 | 0.67 | 0.2 | 0.67 | 7.5 |
| L. Ratte Foet. | | 0.91 | | | | |
| L. Ratte Neug. | Cuatrecasas und Segal (23) | 0.65 | 6.0 | | | 7.3 |
| L. Ratte Erw. | | 0.15 | | 0.12 | 0.4 | |
| Leber Foetus | Shin-Bühring et al. (35) | 0.23-0.27 | 5.0 | | | 8.0 |
| Leber Foetus | | 0.18-0.28 | | 0.16-0.20 | | |
| Leber Erwachs. | | 0.17 | | 0.10 | | |
| Niere Foetus | | 0.17-0.24 | | 0.18-0.20 | | |
| Niere Erwachs. | | 0.15 | | 0.17 | | |
| S.muskel Foet. | eigene Ergebnisse | 0.13-0.37 | 2.0 | 0.13 | 0.67 | 8.0 |
| S.muskel Erw. | | 0.14 | | | | |
| H.muskel Foet. | | 0.19-0.31 | | 0.16-0.18 | | |
| Lunge Foetus | | 0.16-0.26 | | 0.16 | | |
| Hirn Foetus | | 0.22-0.29 | | 0.23 | | |
| Milz Foetus | | 0.23-0.33 | | 0.16-0.19 | | |

[1] menschliches Material, außer wenn gesondert angegeben

Substrathemmung aufgetreten, so daß sie trotz des doppelt so hohen $K_m$-Wertes diese Galaktose-Konzentration wählten. In der vorliegenden Arbeit war die Galaktose-Konzentration 0.67 mM und damit etwa e mal größer als die Michaelis-Konstante.

Die in der Tabelle aufgeführten Autoren verwendeten bei der Bestimmung der Michaelis-Konstanten neben den unterschiedlichen Substratkonzentrationen auch Tris-HCl-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten zwischen pH 7.4 und pH 8.0. Da nur bedingt vorausgesetzt werden kann, daß das für die jeweilige Versuchsanordnung optimale pH-Milieu vorhanden war, müssen alle Vergleiche in der folgenden Diskussion unter diesem Vorbehalt gesehen werden. Das gleiche gilt auch für die oben genannten unterschiedlichen Substratkonzentrationen.

Die $K_m$-Werte, die für E.coli und S.cerevisiae (22, 28) angegeben wurden, sind für das Substrat Galaktose 2-5 mal höher als die Werte, die für erwachsene tierische und menschliche Organe in der Literatur und in dieser Arbeit beschrieben wurden. Die $K_m$-Werte für das zweite Substrat ATP unterschieden sich dagegen nicht von den meisten Literaturangaben und stimmten auch mit den hier gefundenen Werten überein.

Die Michaelis-Konstante der Galaktokinase wurde wiederholt in kultivierten menschlichen Fibroblasten bestimmt (30, 31, 33). Bei diesen Autoren lagen die $K_m$-Werte für Galaktose zwischen 0.18 mM und 1.0 mM Galaktose und waren damit etwas höher als die in Leber, Niere und Skelettmuskel Erwachsener bestimmten Werte, die zwischen 0.14 mM und 0.17 mM Galaktose lagen. Die $K_m$-Werte für ATP von Tedesco und Mellmann (30) und Chacko et al. (31) entsprachen den hier gefundenen Werten, jedoch lagen Shin-Bühring at al. (33) mit 2.1 mM ATP im etwa 10-fachen Bereich.

Die Michaelis-Konstante in menschlichen Leukozyten war bei Tedesco und Mellmann (30) 0.17 mM Galaktose, ein niedrigerer Wert als in Fibroblasten, wo zum Teil $K_m$-Werte bis zu 0.48 mM bestimmt wurden. Das Enzym in Leukozyten hätte danach eine höhere Affinität zu Galaktose als in Fibroblasten, aber eine spezifische Aktivität, die ein Drittel von der in Fibroblasten beträgt (30).

Die Michaelis-Konstanten, die Mathai und Beutler, Blume und Beutler und Shin-Bühring et al. (24, 34, 27) in den Erythrozyten

des Blutes erwachsener Menschen fanden, liegen zwischen 0.10 mM und 0.17 mM Galaktose und stimmen mit den Ergebnissen über Leber, Niere und Skelettmuskel von Erwachsenen aus dieser Arbeit überein. Der $K_m$-Wert für ATP war bei Blume und Beutler (34) mit 0.20 mM bis 0.50 mM ATP bis zu 5 mal höher als in den obigen Organen von Erwachsenen. Somit war $K_m$ für ATP in Erythrozyten wie auch in Leukozyten (30) höher als in foetalen Organen.

Die Michaelis-Konstante für Galaktose in der Leber erwachsener Menschen lag im Bereich der Werte, die Cuatrecasas und Segal (23) in Rattenleber) und Ballard (29) in Schweineleber fanden. In foetaler Leber hatten Shin-Bühring et al. (35) $K_m$-Werte zwischen 0.23 mM und 0.27 mM Galaktose gefunden, die in dieser Arbeit bestätigt wurden. In kultivierten Amnionzellen hatten sie $K_m$ bei 0.34 mM Galaktose gefunden, also etwas höher als in den foetalen Organen in dieser Arbeit.

Die ersten Studien über die Ontogenese der Michaelis-Konstante von der Pränatalzeit über die Postnatalzeit bis zum Erwachsenenalter stammen von Cuatreca as und Segal (23), die die Entwicklung der $K_m$ der Galaktokinase in der Leber foetaler, neugeborener und erwachsener Ratten verfolgten. Sie stellten ein Absinken der $K_m$ mit steigendem Alter der Ratten fest. Während der $K_m$-Wert für Galaktose bei den neugeborenen Ratten um ein Drittel abgenommen hatte, betrug er bei den erwachsenen Ratten nur mehr 1/6 des $K_m$-Wertes bei foetalen Ratten. Zudem trat Substrathemmung durch Galaktose bei den erwachsenen Ratten erst bei einer 8 mal höheren Konzentration auf, als dies bei den foetalen Ratten der Fall war. Auch Produkthemmung durch Galaktose-1-Phosphat trat bei den erwachsenen Ratten erst bei einer 4 mal höheren Konzentration auf. Ein weiterer Unterschied wurde in Bezug auf die Stabilität festgestellt. Der Aktivitätsverlust der Galaktokinase der erwachsenen Ratte war nach 1 Tag bei 10°C mehr als doppelt so groß als bei der neugeborenen Ratte. Alle diese Unterschiede veranlaßten Cuatrecasas und Segal zu der Behauptung, es gäbe mindestens zwei verschiedene Enzyme in der Rattenleber, die in der Lage sind, Galaktose zu phosphorylieren.

Als nächste gingen Mathai und Beutler (24) dieser Frage nach, indem sie die Entwicklung der $K_m$-Kinetik zum ersten Mal in menschlichem Material, nämlich in den Erythrozyten aus dem

Nabelschnurblut Neugeborener und aus dem Blut Erwachsener untersuchten. Sie fanden einen geringen, nach ihrer Aussage statistisch signifikanten Unterschied in der $K_m$ für Galaktose der beiden Hämolysate: Bei den Neugeborenen war $K_m$ 0.23 mM, bei den Erwachsenen 0.14 mM Galaktose. Einen Unterschied in der Produkthemmung durch Galaktose-1-Phosphat wie bei Cuatrecasas und Segal konnten diese Autoren in ihren Untersuchungen nicht bestätigen. Auch die Säulenchromatographie der Galaktokinase der beiden Hämolysate vermochte keine Trennung des Enzyms des Neugeborenen von dem des Erwachsenen herbeizuführen. Mathai und Beutler schlossen aber die Existenz eines leicht veränderten Enzyms im Neugeborenenblut nicht aus.

Shin-Bühring et al. (27) wiesen erneut in menschlichen Erythrozyten ein Absinken der Michaelis-Konstante von der Foetalzeit bis zum Erwachsenenalter nach. Während $K_m$ für Galaktose bei einem Foeten 0.40 mM und bei einem Neugeborenen 0.32 mM war, sank der Wert bei einem 5 Monate alten Säugling auf 0.21 mM und bei einem Erwachsenen auf 0.16 mM ab.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Michaelis-Konstanten hauptsächlich in foetalen Organen bestimmt. Da über die Entwicklung der $K_m$ in menschlichen Geweben noch nichts bekannt war, wurden in einigen Organen von Erwachsenen Vergleichswerte bestimmt. Aus Stabilitätsgründen wurde frisches Biopsiematerial verwendet; wegen Beschaffungsschwierigkeiten konnten nur Leber, Niere und Skelettmuskel untersucht werden. Die $K_m$-Werte für Galaktose differierten bei Foeten und Erwachsenen in einigen Fällen nur wenig, waren aber in mehreren Fällen in foetalen Organen etwas höher als in Organen von Erwachsenen. Die $K_m$-Werte für ATP wiesen in der Niere in Bezug auf die Entwicklung keine Unterschiede auf. In der Leber war $K_m$ für ATP bei einem Erwachsenen mit 0.10 mM etwas niedriger als bei den Foeten mit 0.16 mM und 0.20 mM. Ein vielleicht vorhandener , geringer Unterschied der Michaelis-Konstanten in der Entwicklung in menschlichen Organen müßte durch eine größere Anzahl von Versuchen als statistisch signifikant bewiesen werden. Auf Grund der vorliegenden Untersuchungen ist es unwahrscheinlich, daß sich die $K_m$-Werte in den untersuchten menschlichen Organen in ihrer Entwicklung ebenso stark verändern, wie dies in der Rattenleber der Fall war.

Der Vergleich der verschiedenen foetalen Organe bezüglich ihrer Michaelis-Konstanten für Galaktose zeigt keine auffallenden Unterschiede. Insgesamt betrachtet, waren aber die $K_m$-Werte in Leber, Niere und Lunge etwas niedriger als in Hirn, Milz, Herz- und Skelettmuskel. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich nicht relevant, da $K_m$ nur in höchstens 4 Proben pro Organ analysiert wurde. Wenn man annähme, daß Leber und Niere, die eine höhere Galaktokinase-Aktivität besitzen als die anderen untersuchten Organe, tatsächlich eine höhere Affinität zu Galaktose besässen, so würde dies Tedescos und Mellmanns (30) Beobachtung widersprechen. Sie hatten festgestellt, daß Fibroblasten, die 3 mal mehr Galaktokinase-Aktivität besitzen als Leukozyten, zum Teil eine geringere Affinität zu Galaktose aufweisen als Leukozyten.

Die Michaelis-Konstanten für ATP waren bei den verschiedenen foetalen Organen im allgemeinen sehr ähnlich. Ein etwas niedrigerer Wert beim Skelettmuskel und ein etwas höherer Wert beim Hirn sind Einzelwerte, die noch genauer bestimmt werden müßten.

Die Hemmung der Galaktokinase durch das Substrat Galaktose, die als ein weiteres Kriterium zur Enzymcharakterisierung und -Unterscheidung gelten kann, wurde nur in wenigen Arbeiten beschrieben, obwohl sie möglicherweise überall aufgetreten war. Die Substrathemmung war in Erythrozyten (24), in Schweineleber (29) und in den hier untersuchten foetalen Organen etwa gleich. Sie begann bei Galaktosekonzentrationen, die etwa 3-10 mal höher als die jeweilige Michaelis-Konstante waren. Cuatrecasas und Segal (23) beschrieben für Rattenleber eine altersabhängige Substrathemmung. Sie begann bei einer Galaktosekonzentration, die bei foetalen Ratten halb so groß war wie $K_m$ und bei erwachsenen Ratten 20 mal größer. Die gleichen Autoren beschrieben bei erwachsenen Ratten eine Substrathemmung durch hohe ATP-Konzentrationen ab etwa 20 mM ATP. In der vorliegenden Arbeit wurde in foetalen Organen bis zu 10 mM ATP keine Substrathemmung beobachtet.

Säulenchromatographie der Galaktokinase:

Die Struktur der Galaktokinase ist eine wichtige, noch ungeklärte Frage. Der Versuch, ihr näher zu kommen, führte in den

bisherigen Untersuchungen hauptsächlich zu der Bestimmung des Molekulargewichts und der Suche nach Untereinheiten und Isoenzymen.

Sherman und Adler (22) bestimmten in gereinigter Galaktokinase von E.coli durch Zentrifugieren eine Sedimentationsrate, die einem Molekulargewicht von etwa 20 000 entspricht. Bei der chromatographischen Passage des Enzyms durch eine DEAE-Cellulose-Säule wurde die gesamte Aktivität in einem Gipfel eluiert.

Gulbinsky und Cleland (36), die ebenfalls mit gereinigter Galaktokinase von E.coli arbeiteten, erreichten weder durch Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese noch durch DEAE-Cellulose-Chromatographie oder Bio-Gel-Chromatographie eine Trennung der Galaktokinase-Aktivität.

Mit ähnlichen Methoden versuchten Blume und Beutler (34), über die Struktur der Galaktokinase in menschlichen Erythrozyten Aufschluß zu erhalten. Durch Gel-Chromatographie mit Sephadex bestimmten sie in dem hochgereinigten Enzym ein Molekulargewicht zwischen 53 000 und 57 000. Bei der Disk-Elektrophorese mit Polyacrylamid traten zwei Banden auf, eine an der Position eines Molekulargewichts von 53 000 bis 57 000 und eine bei 25 000 bis 27 000. Sie folgerten daraus, daß das Enzym ein Molekulargewicht von etwa 55 000 habe und ein Dimer sei, das aus zwei gleich großen Untereinheiten bestünde. In einer Literaturzusammenstellung führten sie unter anderem eine widersprüchliche Arbeit von Rustum und Barnard (37) über Hefe-Galaktokinase auf, in der diese ein Molekulargewicht von 100 000 und eine Größe der Untereinheiten von 23 000 beschrieben hatten.

In der Erythrozyten-Galaktokinase von Neugeborenen und Erwachsenen hatten Mathai und Beutler (24) einen geringen, aber statistisch signifikanten Unterschied in den Michaelis-Konstanten des Enzyms für Galaktose gefunden. Zur weiteren Klärung führten sie mit teilweise gereinigter Galaktokinase eine Säulenchromatographie auf Whatman-DE-Ionenaustauscherharz durch, fanden jedoch keinen Unterschied im Elutionsmuster des Enzyms. Dieses Ergebnis schließt nach ihrer Meinung nicht aus, daß es in den Erythrozyten von Neugeborenen dennoch ein leicht verändertes Enzym geben könnte, das jedoch mit anderen Verfahren von dem Enzymtyp des Erwachsenen abgegrenzt werden müßte.

Auch Vigneron (38) suchte in Erythrozyten von Neugeborenen und Erwachsenen, im Gegensatz zu Mathai und Beutler mittels Stärkegel-Elektrophorese, eine Unterscheidung der Enzyme. In beiden Gel-Trägern konnte er nur je einen Fluoreszenzstreifen nachweisen. Doch das Enzym der Neugeborenen-Erythrozyten entwikkelte eine höhere Elektrophorese-Beweglichkeit: Es war im Stärkegel weiter gewandert als das Enzym der Erwachsenen-Erythrozyten. Es mußte also eine andere Ladung besitzen. Nach der Interpretation von Vigneron scheint das Enzym des Foeten damit ein besonderes Charakteristikum zu besitzen.

Nachdem in Galaktokinase von E.coli und menschlichen Erythrozyten verschiedenen Alters Versuche zur Trennung des Enzyms erfolgt waren, wurde in dieser Arbeit erstmals in Organen von Foeten eine säulenchromatographische Trennung der Galaktokinase durchgeführt. Bedingt durch die Instabilität des Enzyms konnten nur wenige Elutionsmuster, bei denen die Aktivitätsausbeute hoch genug war, ausgewertet werden. In Leber- und Lungengewebe wurde die Galaktokinase-Aktivität insgesamt 3 mal in zwei Portionen eluiert, wobei der mengenmäßige Hauptanteil in der 2.Portion erschien. Dagegen wurde in anderen Versuchen bei keinem Organ eine Verteilung der Aktivität auf mehrere Portionen beobachtet. Damit ist nicht ausgeschlossen, daß Organe wie Niere, Milz, Hirn, Herz- und Skelettmuskel nicht doch aus mehreren Untereinheiten bestehen könnten, und daß die Aktivität, die in einem weiteren der mehreren Gipfeln erscheinen würde, unter den jetzigen Bedingungen nicht genügend stabilisiert werden kann. Die Tatsache, daß gerade in Leber- und Lungengewebe ein weiterer Gipfel identifiziert werden konnte, steht im Widerspruch zu der in dieser Arbeit beobachteten, im Vergleich mit anderen Organen höheren Temperaturempfindlichkeit des Enzyms in Leber und Lunge. Es ist zu wenig über in vitro und in vivo stabilisierende und zerstörende Faktoren in Geweben bekannt, um solche oder auch die in der Literatur beschriebenen Unterschiede erklären zu können.

Es ist unwahrscheinlich, daß die Instabilität des in der 4. bzw. 7. Fraktion in Lunge bzw. Leber gefundenen ersten Gipfels auf die hemmende Wirkung von NaCl zurückzuführen ist. In diesem anfänglichen Elutionsbereich ist nämlich die bei 0.01 M beginnende NaCl-Konzentration noch vernachlässigbar gering.

Die hier beschriebenen Gipfel der Hauptaktivität waren relativ breit, erstreckten sich zum Teil über 8 Fraktionen. Möglicherweise setzen sich diese Gipfel noch aus mehreren Komponenten zusammen, wofür z.B. die Andeutung einer "Aktivitätsschulter" in dem Elutionsmuster foetaler Milz-Galaktokinase sprechen könnte. Es wäre interessant, ob durch isoelektrische Fokussierung eine weitere Auftrennung eines breiten Gipfels erreicht werden kann, so wie es Schapira et al. (44) kürzlich mit dieser Methode bei der Uridyltransferase in verschiedenen menschlichen Organen gelungen war.

Die Form des eluierten Aktivitätsgipfels könnte auch durch die Art des verwendeten Puffers beeinflußt sein. Bisher nicht veröffentlichte Untersuchungen in unserem Labor ergaben Folgendes: Tris-Maleat-Puffer, pH 7.0, wirkte nicht hemmend auf die Galaktokinase und lieferte eine um etwa 10% höhere Aktivität bei der Säulenchromatographie des Enzyms als NaCl-Puffer. Allerdings war die Trennung der Aktivität etwas schlechter als mit NaCl. Phosphat-Puffer sei dem NaCl-Puffer bei der Trennung überlegen, hätte aber stärker hemmende Eigenschaften und würde deshalb eine höhere Verdünnung der Eluate vor dem Enzymtest erfordern. Vigneron (38) verwendete bei der oben erwähnten Stärkegel-Elektrophorese Kalium-Phosphat-Puffer bis zu einer Konzentration von 0.1 M. Vielleicht könnte mit der gleichen Methode unter Verwendung eines anderen Puffers ein deutlicherer Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität der Enzyme herauskommen.

Die Erforschung der Struktur der Galaktokinase wird auch weiterhin eine Herausforderung an die Untersucher darstellen. Die vielen, großenteils widersprüchlichen Ergebnisse der Forschung der letzten 15 Jahre lassen es heute noch nicht zu, genaue Aussagen über das Molekulargewicht, die Zahl der Untereinheiten und die Existenz von Isoenzymen zu machen. Es ist denkbar, daß das Enzym in verschiedenen Organismen verschiedene Untereinheiten besitzt, die sich in ihren biochemischen und elektrophysikalischen Eigenschaften unterscheiden.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand dieser Arbeit war die Galaktokinase in Leber, Niere, Milz, Lunge, Hirn, Herz- und Skelettmuskel menschlicher Foeten im Alter von 7-28 Schwangerschaftswochen. Das Enzym wurde untersucht im Hinblick auf einige biochemische Eigenschaften, auf Kinetik und Ontogenese der Michaelis-Konstanten, auf seine spezifische Aktivität sowie im Hinblick auf die Struktur des Enzyms selbst.

Die Homogenisate der Organgewebe wurden in einem Enzymtest mit $^{14}C$-markierter Galaktose versetzt, das Reaktionsprodukt durch Säulenchromatographie isoliert und mit dem Szintillationszähler quantitativ bestimmt.

Die Stabilität der Galaktokinase war bei Temperaturen von 4-56°C nach 10-60 Minuten stark reduziert; ebenso bei der Aufbewahrung bei -20°C über 1-3 Wochen, wobei bereits das Einfrieren bzw. Auftauen der Homogenisate hohe Aktivitätsverluste verursachte.

Es fand eine Enzymhemmung durch Chlorid statt. Bei 0.1 M $Cl^-$ im Testansatz war die Aktivität um 10-30% vermindert.

Das pH-Optimum wurde uneinheitlich bei pH 7.4-7.9 bei teils mono-, teils biphasischem Verlauf der Kurven gefunden.

Die Michaelis-Konstanten $K_m$ der Galaktokinase lagen in den foetalen Organen bei 0.17-0.37 mM für Galaktose und 0.13-0.23 mM für ATP als Substrate. Vergleichswerte in Organen von Erwachsenen lagen bei 0.14-0.17 mM für Galaktose und 0.10-0.17 mM für ATP, so daß eine geringe Abnahme von $K_m$ während der Ontogenese erkennbar wurde.

Bei der säulenchromatographischen Trennung der Galaktokinase gelang in Leber und Lunge der Nachweis von zwei Enzym-Komponenten, nicht jedoch in anderen Organen. Das Vorliegen von Isoenzymen in zwei foetalen Organen läßt vermuten, daß der Nachweis in anderen Organen durch verbesserte Trennverfahren möglich sein könnte.

# VII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|---|
| EC | Enzyme Catalogue |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| UDP | Uridindiphosphat |
| NAD | Nicotinamidadenindinucleotid |
| $K_m$ | Michaelis-Konstante |
| $CuSO_4$ | Kupfersulfat |
| $MgCl_2$ | Magnesiumchlorid |
| Tris-HCl | Tris-Hydrochlorid |
| NaF | Natriumfluorid |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| HCl | Hydrochlorid |
| NaCl | Natriumchlorid |
| $Na_2CO_3$ | Natriumcarbonat |
| µCi | Mikrocurie |
| cpm | counts per minute |
| U | Unit |
| DEAE-Cellulose | Diäthylaminoäthyl-Cellulose |
| SSW | Schwangerschaftswoche |

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

(1) Gitzelmann, R.: Deficiency of erythrocyte galaktokinase in a patient with galactose diabetes. Lancet 2 (1965), 670

(2) Reuß, A. von: Zuckerausscheidung im Säuglingsalter. Wien. Med. Wschr. 58 (1908), 799

(3) Kalckar, H. M., Anderson, E. P. and Isselbacher, K. J.: Galactosemia, a congenital defect in nucleotide transferase. Biochim. Biophys. Acta 20 (1956), 262

(4) Caputto, R., Leloir, L. F. and Trucco, R. E.: Lactase and lactose fermentation in Saccharomyces fragilis. Enzymol. 12 (1948), 350

(5) Wells, W. W.: Galactitol metabolism. In Hsia, D. Y. (ed.): Galactosemia (1969), 227

(6) Kinoshita, J. H., Merola, L. O. and Dikmak, E.: Osmotic changes in experimental galactose cataracts. Exp. Eye Res. 1 (1962), 405

(7) Fanconi, G.: Hochgradige Galaktose-Intoleranz (Galaktose-Diabetes) bei einem Kind mit Neurofibromatose Recklinghausen. Jb. Kinderheilk. 138 (1933), 1

(8) Gitzelmann, R., Curtius, H. C. and Müller, M: Galactitol excretion in the urine of a galactokinase-deficient man. Biochem. Biophys. Res. Comm. 22 (1966), 437

(9) Thalhammer, O., Gitzelmann, R. and Pantlischko, M.: Hypergalactosemia and galactosuria due to galactokinase deficiency in a newborn. Pediatrics, 42 (1968), 441

(10) Dahlquist, A., Gamstorp, I. and Madsen, H.: A patient with hereditary galactokinase deficiency. Acta Paediat. Scand., 59 (1970), 669

(11) Linneweh, F., Schaumlöffel, E. and Vetrella, M.: Galaktokinase-Defekt bei einem Neugeborenen. Klin. Wschr. 48 (1970), 31

(12) Monteleone, J. A., Beutler, E., Monteleone, P. L., Utz, C. L. and Casey, E. C.: Cataracts, galactosuria and hypergalactosemia due to galactokinase deficiency in a child: Studies of a kindred. Amer. J. Med., 50 (1971), 403

(13) Cook, J. G. H., Don, N. A. and Mann, T. P.: Hereditary galactokinase deficiency. Arch. Dis. Child. 46 (1971), 465

(14) Kerr, M. M., Logan, R. W., Cant, J. S. and Hutchison, J. H.: Galactokinase deficiency in a newborn infant. Arch. Dis. Child. 46 (1971), 864

(15) Pickering, W. R. and Howell, R. R.: Galactokinase deficiency: Clinical and biochemical findings in a new kindred. J. Pediat. 81 (1972), 50

(16) Olambiwonnu, N. O., McVie, R., Ng, W. G., Frasier, S. D. and Donnell, G. N.: Galactokinase deficiency in twins: Clinical and biochemical studies. Pediatrics, 53 (1974), 314

(17) Gitzelmann, R.: Galactokinase deficiency. In Hsia, D. Y. (ed.): Galactosemia (1969), 155

(18) Mayes, J. S. and Guthrie, R.: Detection of heterocygotes for galactokinase deficiency in a human population. Biochem. Genet. 2 (1968), 219

(19) Guthrie, R.: Glucose supplementation method for confirmation of inhibitory substance as galactose in galactosemia test. Progress Report, July 1966 (a leaflet)

(20) Ng, W. G., Donnell, G. N. and Bergren, W. R.: Galactokinase activity in human erythrocytes of individuals of different ages. J. Lab. Clin. Med. 66 (1965), 115

(21) Ng, W. G., Donnell, G. N., Bergren, W. R., Alfi, O. and Golbus, M. S.: Prenatal diagnosis of galactosemia. Clin. Chim. Acta 74 (1977), 227

(22) Sherman, J. R. and Adler, J.: Galactokinase from Escherichia coli. J. Biol. Chem. 238 (1963), 873

(23) Cuatrecasas, P. and Segal, S.: Mammalian galactokinase: developmental and adaptive characteristics in the rat liver. J. Biol. Chem. 240 (1965), 2382

(24) Mathai, C. K. and Beutler, E.: Biochemical characteristics of galactokinase from adult and fetal human red cells. Enzymologia 33 (1967), 224

(25) Beutler, E., Paniker, N. V. and Trinidad, F.: The assay of red cell galactokinase. Biochem. Med. 6 (1971), 325

(26) Beutler, E. and Matsumoto, F.: Rapid simplified assay for galaktokinase acticity in whole blood. J. Lab. Clin. Med. 82 (1973), 818

(27) Shin-Bühring, Y. S., Osang, M., Ziegler, R. and Schaub, J.: A simple assay for galactokinase using DEAE-cellulose column chromatography. Clin. Chim. Acta 74 (1977), 1

(28) Schell, M. A. and Wilson, D. B.: Purification and properties of galactokinase from Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 252 (1977), 1162

(29) Ballard, F. J.: Purification and properties of galactokinase from pig liver. Biochem. J. 93 (1966), 347

(30) Tedesco, T. A. and Mellmann, W.: Galactose-1-phosphate uridyltransferase and galactokinase activity in cultured human diploid fibroblasts and peripheral blood leukocytes. J. Clin. Invest. 48 (1969), 2390

(31) Chacko, C. M., McCrone, L. and Nadler, H.: A study of galactokinase and glucose 4-epimerase from normal and galactosemic skin fibroblasts. Biochim. Biophys. Acta 284 (1972), 552

(32) Hill, H. Z.: The effect of pH on incorporation of galactose by a normal human cell line and cell lines from patients with defective galactose metabolism. J. Cell. Physiol. 87 (1976), 313

(33) Shin-Bühring, Y. S., Leitner, H., Henseleit, H., Wirtz, A., Haas, B. and Schaub, J.: Characteristics of galactokinase and galactose-1-phosphate uridyltransferase in cultivated fibroblasts and amniotic fluid cells. Human Genetics, (1979), im Druck

(34) Blume, K.-G. and Beutler, E.: Purification and properties of galactokinase from human red blood cells. J. Biol. Chem. 246 (1971), 6507

(35) Shin-Bühring, Y. S., Beier, T., Tan, A., Osang, M. and Schaub, J.: The activity of galactose-1-phosphate uridyltransferase and galactokinase in human fetal organs. Pediat. Res. 11 (1977), 1003

(36) Gulbinsky, J. S. and Cleland, W. W.: Kinetic studies of Escherichia coli galactokinase. Biochem. 7 (1968), 566

(37) Rustum, Y. M. and Barnard, E. A.: Induced galactokinase of yeast. Fed. Proc. 30 (1971), 1122

(38) Vigneron, C.: Electrophoresis of erythrocyte galactokinase. Enzyme 12 (1971), 426

(39) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 (1951), 265

(40) Michaelis, L. and Menten, M. L.: Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochem. Z. 49 (1913), 333

(41) Lineweaver, H. and Burk, D.: The determination of enzyme dissociation constants. J. Amer. Chem. Soc. 56 (1934), 658

(42) Mattenheimer, H.: Die Theorie des enzymatischen Tests. Boehringer Mannheim GmbH (1976)

(43) Hoppe-Seyler, F. und Thierfelder, H.: Handbuch der physiologisch- und pathophysiologisch-chemischen Analyse. Bd. IV/I, Springer Verlag Berlin ( 1964)

(44) Schapira, F. and Kaplan, J. C.: Electrophoretic abnormality of galactose-1-phosphate uridyltransferase in galactosemia. Biochem. Biophys. Res. Comm. 35 (1969), 451

(45) Donnell, G. N., Bergren, W. R. and Ng, W. G.: Galactosemia. Biochem. Med. 1 (1967), 29

DANKSAGUNG

Prof. Dr. Klaus Betke danke ich für die freundliche Überlassung des Arbeitsplatzes.

Priv.-Doz. Dr. Jürgen Schaub danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, für seinen freundlichen und sachlichen Rat - besonders bei der Fertigstellung der Arbeit - und dafür, daß er immer Zeit hatte.

Dr. Yoon Shin-Bühring danke ich für die Vermittlung theoretischer Grundlagen und die Anleitung zur Versuchsdurchführung. Von ihr und allen Mitarbeitern kam viel Hilfe und die gute Atmosphäre im Labor, die sehr zum Gelingen der Arbeit beitrug.

# LEBENSLAUF

Am 25. Mai 1953 wurde ich als die Ältere von zwei Töchtern des Ingenieurs Carl Pouget und seiner Frau Maria, geb. Gmehling, in München geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschule Pullach i. Isartal trat ich 1963 in das neusprachliche Gymnasium Icking ein. 1969/1970 verbrachte ich ein Jahr in den Vereinigten Staaten, wo ich im Bundesstaat Maine eine High School besuchte. 1972 legte ich in Icking die Reifeprüfung ab.

Im November 1972 begann ich an der Ludwig-Maximilians Universität München das Medizinstudium und legte dort im März 1975 die Ärztliche Vorprüfung ab. Nach dem 1. Teil der Ärztlichen Prüfung im März 1976 begann ich mit meiner Doktorarbeit im Dr. von Hauner'schen Kinderspital in München. Im März 1978 bestand ich den 2. Teil der Ärztlichen Prüfung. Anschließend war ich im Praktischen Jahr in den Fächern Neurologie und Innere Medizin tätig. Zur Zeit arbeite ich im Fach Chirurgie und bereite mich auf den 3. Teil der Ärztlichen Prüfung im Frühjahr 1979 vor.